



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

INFEÇÃO POR ASPERGILLUS EM DOENTES SUJEITOS A TERAPÊUTICA IMUNOSSUPRESSORA

Trabalho submetido por
Ana Sofia Cristino Silva
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Novembro de 2016



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

INFECÇÃO POR ASPERGILLUS EM DOENTES SUJEITOS A TERAPÊUTICA IMUNOSSUPRESSORA

Trabalho submetido por
Ana Sofia Cristino Silva
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Mestre Teresa Nascimento

Novembro de 2016

“Ninguém é tão grande que não possa aprender, nem tão pequeno que não possa ensinar.”

Agradecimentos

Decerto que estas palavras não são suficientes para agradecer da forma que eu acho que as pessoas que fazem parte da minha vida merecem, mas são o mais sinceras possível.

Obrigado aos meus amigos, pelo apoio e amizade incondicionais. Obrigada aos amigos de longa data por me acompanharem há tanto tempo e aos que conheci recentemente por me mostrarem que valeu a pena.

Aos meus pais e ao meu irmão, um agradecimento especial, por me terem tornado na pessoa que eu sou hoje, por terem feito questão de me dar tudo aquilo que puderam, pelo amor, compreensão e encorajamento. E por me terem proporcionado os melhores 23 anos da minha vida.

A todos, muito obrigado!

Resumo

A descoberta e o desenvolvimento dos fármacos imunossupressores permitiram um grande avanço na medicina, desde possibilitarem o sucesso da transplantação de órgãos, até ao sucesso terapêutico de algumas doenças cancerígenas, entre outros. Por outro lado, o aumento do uso destes fármacos veio também aumentar a população de risco de infeções oportunistas. Um dos agentes responsáveis por essas infeções são os fungos, nomeadamente do género *Aspergillus*. Trata-se de um fungo ubiquitário, ao qual estamos constantemente expostos e em contacto com os seus esporos sem patologia associada. Porém, é na população imunodeprimida que este agente patogénico encontra o seu hospedeiro ideal. Ao encontrar défice do sistema imunitário, consegue colonizar com subsequente infeção, denominada aspergilose, que se pode manifestar de várias maneiras como por exemplo alergias e doenças respiratórias, sendo a forma invasiva e disseminada a mais grave.

Para o tratamento da aspergilose existem vários antifúngicos disponíveis, sendo que os triazóis são os fármacos de eleição, não só para o tratamento como para a prevenção. Infelizmente nem sempre o tratamento é bem-sucedido, em grande parte porque o diagnóstico é quase sempre tardio. Os seus sintomas, muitas vezes inespecíficos, e as técnicas de diagnóstico pouco eficientes são os principais responsáveis pela demora do início da terapêutica. Apesar de nos últimos anos terem surgido novas técnicas de diagnóstico e tratamentos cada vez mais eficazes, a sua mortalidade continua a atingir níveis elevados.

Palavras-chave: Imunossupressores, infeção, *Aspergillus*, aspergilose.

Abstract

The discovery and the development of immunosuppressive drugs, allowed a breakthrough in medicine, from making possible the success of organ transplantation, to the therapeutic success of some cancerous diseases, among others. On the other hand, the increasing use of these medicines has increased the population at risk of opportunistic infections. One of the responsible agents for these infections are fungi, including de genus *Aspergillus*. It is an ubiquitous fungus, to which we are constantly exposed and in touch with spores without associates pathology. However it is in the immunosuppressed population that this pathogen finds his ideal host. By finding the immune system deficit, it can colonize with subsequent infection, named aspergillosis, which can manifest in many ways, such as allergies and respiratory diseases, being the invasive and disseminated form the most serious.

For the treatment of aspergillosis there are several antifungals, being that triazoles are the drugs of choice, not only to treat but also to prevent it. Unfortunately not always the treatment is successful, largely because the diagnosis is often delayed. Its symptoms, often unspecific, and inefficient diagnostic techniques are the main responsible for the delay initiation of therapy. Although in the last years new techniques of diagnosis and increasingly effective treatments have emerged, its mortality continues to reach high levels.

Keywords: Immunosuppressive drugs, infection, *Aspergillus*, aspergillosis.

Índice Geral

Índice de Figuras.....	7
Índice de Tabelas.....	9
Lista de Abreviaturas	11
I. Introdução.....	13
II. Desenvolvimento.....	15
1. Ecologia do género <i>Aspergillus</i>	15
1.1. <i>Aspergillus fumigatus</i>	19
1.2. <i>Aspergillus flavus</i>	20
1.3. <i>Aspergillus niger</i>	21
1.4. <i>Aspergillus terreus</i>	22
1.5. <i>Aspergillus nidulans</i>	23
2. Epidemiologia.....	24
3. Fatores fúngicos implicados na aspergilose.....	28
3.1. Fatores de virulência.....	29
4. Fatores do hospedeiro favorecedor da aspergilose.....	30
4.1. Terapêutica imunossupressora.....	30
4.2. Resposta imunitária.....	37
5. Manifestações clínicas.....	40
5.1. Aspergilose pulmonar crónica.....	41
5.2. Aspergilose invasiva.....	42
6. Diagnóstico	44
6.1. Laboratorial.....	45

6.2. Imagiologia.....	47
7. Tratamento	49
7.1. Polienos.....	50
7.2. Triazóis.....	51
7.3. Equinocandinas.....	53
8. Prevenção.....	56
III. Conclusão	58
IV. Bibliografia.....	59

Índice de Figuras

Figura 1 – Observação microscópica de <i>Aspergillus</i> spp. Ampliação total de 400x.....	16
Figura 2 – Observação microscópica da estrutura de <i>Aspergillus</i> spp. Ampliação total de 400x.....	17
Figura 3 – Aspecto macroscópico de uma cultura de <i>Aspergillus niger</i> . 5A – esporos pretos na superfície. 5B – Reverso branco. Retirado e adaptado de (Ratnaweera, de Silva, Williams & Andersen, 2015).....	18
Figura 4 – Observação microscópica de <i>Aspergillus fumigatus</i> . Ampliação total de 400x.....	19
Figura 5 – <i>Aspergillus flavus</i> . 100x. Retirado e adaptado de (Cruz, 2014).....	21
Figura 6 – <i>Aspergillus niger</i> . 100x. Retirado e adaptado de (Cruz, 2014).....	21
Figura 7 – <i>Aspergillus terreus</i> . 100x. Retirado e adaptado de (Cruz, 2014).....	22
Figura 8 – Conídios acessórios de <i>Aspergillus terreus</i> . Barra de escala: 20 µm. Retirado e adaptado de (Deak <i>et al.</i> , 2009).....	23
Figura 9 – <i>Aspergillus nidulans</i> . 100x. Retirado e adaptado de (Cruz, 2014).....	23
Figura 10 – Taxa de sobrevivência por população de risco. Retirado e adaptado de (Steinbach <i>et al.</i> , 2012).....	27
Figura 11 – Estrutura química da gliotoxina. Retirado e adaptado de (Chotirmall <i>et al.</i> , 2014).....	29
Figura 12 – Esquema representativo da resposta imunitária do hospedeiro à infecção por <i>Aspergillus</i> . Retirado e adaptado de (Garcia-Vidal <i>et al.</i> , 2013).....	39
Figura 13 – As diferentes manifestações resultantes do estado imunitário do hospedeiro. Retirado e adaptado de (Zmeili & Soubani, 2007; Thompson & Patterson, 2011)....	40
Figura 14 – Radiografia ao tórax mostrando a presença de um Aspergiloma na zona apical do pulmão esquerdo. Retirado e adaptado de (Ofori <i>et al.</i> , 2016).....	41

Figura 15 – Critérios de diagnóstico da aspergilose. Retirado e adaptado de (Pauw <i>et al.</i> , 2008).....	44
Figura 16 – Uma imagem de tomografia computadorizada exibindo de um halo num caso de aspergilose pulmonar invasiva. Retirado e adaptado de (Greene, 2005).....	47
Figura 17 – Imagem de uma lesão provocada pela aspergilose invasiva disseminada. Retirado e adaptado de (Kousha, Tadi & Soubani, 2011).....	48
Figura 18 – Estrutura química da Anfotericina B. Retirada e adaptada de (Tevyashova <i>et al.</i> , 2013).....	50
Figura 19 – Estrutura química do posaconazol em comparação com o itraconazol. Retirado e adaptado de (Groll & Lehnbecher, 2008).....	53

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Principais espécies potencialmente patogénicas de <i>Aspergillus</i> e a sua prevalência. Retirado e adaptado de (Steinbach <i>et al.</i> , 2012).....	15
Tabela 2 – Características microscópicas dos fungos do género <i>Aspergillus</i> . Retirado e adaptado de (Prakash & Jha, 2014).....	18
Tabela 3 – Coloração das colónias de <i>Aspergillus spp.</i> Retirado e adaptado de (Prakash & Jha, 2014).....	19
Tabela 4 – Incidência de aspergilose invasiva em doentes sujeitos a transplantes. Retirado e adaptado de (Herbrecht <i>et al.</i> , 2012).....	26
Tabela 5 – Incidência de aspergilose invasiva em doentes de cancro. Retirado e adaptado de (Herbrecht <i>et al.</i> , 2012).....	26
Tabela 6 – A evolução dos imunossupressores ao longo dos anos. Retirado e adaptado de (Malat & Culkin, 2016).....	31
Tabela 7 – Resumo das terapêuticas recomendadas para a aspergilose. Retirado e adaptado de (Patterson <i>et al.</i> , 2016).....	54
Tabela 8 – Terapêutica da profilaxia da aspergilose invasiva. Retirado e adaptado de (Patterson <i>et al.</i> , 2016).....	56

Lista de Abreviaturas

ABCD	<i>Amphotericin B Colloidal Dispersion</i>
ABLC	<i>Amphotericin B Lipid Complex</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CYP	Citocromo P
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EUA	Estados Unidos da América
GM	Galactomanano
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
IV	Intravenoso
L-AMB	<i>Liposomal Amphotericin B</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF	Fator de Necrose Tumoral
EU	União Europeia

I. Introdução

Já passaram 174 anos desde que Bennett descreveu pela primeira vez, em Edimburgo, uma infecção no Homem por *Aspergillus*, no seu trabalho “On the Parasitic Vegetable Structures found growing in Living Animals”. As infeções por *Aspergillus* podem manifestar-se sob forma de reações alérgicas, toxicoses e infeções. Ao conjunto de todas as manifestações clínicas que este fungo pode causar denominamos de aspergilose (Prakash & Jha, 2014).

O trato respiratório é o foco de infeção mais recorrente no Homem, mas não é o único, e esse é um dos fatores que vai determinar o tipo de aspergilose (Paulussen *et al*, 2016). Por exemplo, as doenças alérgicas ocorrem depois da exposição repetida a conídios e/ou antigénios de *Aspergillus* e podem ser associadas a asma, sinusite e alveolite (Denning *et al.*, 2014). Já as micotoxicoses são causadas pelas toxinas produzidas por este fungo e podem entrar no hospedeiro através da sua inalação, ingestão ou contacto direto, sendo que a maioria das micotoxicoses resulta da ingestão de alimentos contaminados (Murray, Rossenthal & Pfaller, 2010). O desenvolvimento da infeção normalmente só ocorre em doentes imunodeprimidos, o que significa que o agente patogénico beneficia da diminuição das defesas do hospedeiro, sendo por isso considerada infeção oportunista (Murray *et al.*, 2010). Nestes casos, o estado imunitário debilitado vai, não só promover o aparecimento da infeção oportunista, como vai ditar o seu curso e o seu prognóstico (Prakash & Jha, 2014; Kosmidis & Denning, 2015). As infeções podem facilmente progredir para formas invasivas e letais no sistema respiratório, e posteriormente disseminar para outros órgãos. Nos últimos anos, a aspergilose invasiva tem vindo a aumentar, particularmente em indivíduos com o sistema imunitário gravemente comprometido (Paulussen *et al*, 2016).

Para além do estado imunitário do hospedeiro, a aspergilose tem vários fatores predisponentes que contribuem para o seu sucesso como patologia, desde os fatores de virulência do fungo, incluindo as suas características morfológicas, a sua capacidade de tolerância ao *stress* e a sua capacidade de penetrar e colonizar o hospedeiro. Em relação ao agente patogénico, são o local e a extensão da colonização no hospedeiro, que permitem diferenciar a forma como a doença se vai manifestar (Paulussen *et al*, 2016). A hipótese da genética também pode ter influência no curso e no prognóstico da doença,

estando descrito a existência de uma predisposição genética para a recorrência da infecção (Kosmidis & Denning, 2015).

Atualmente ainda existem alguns obstáculos na gestão da aspergilose, como a dificuldade no seu diagnóstico e as opções terapêuticas limitadas, que fazem com que a sua taxa de mortalidade continue a ser muito alta (50-95%) (Binder & Lass-Flörl, 2013). Assim, e apesar da sua prevalência ser considerada baixa, a aspergilose continua a constituir um desafio no que respeita ao sucesso do seu tratamento (Schweer et al., 2014).

Este trabalho tem como propósito reunir a informação disponível sobre os vários elementos envolvidos na infecção por *Aspergillus* em doentes sujeitos a terapêutica imunossupressora. A abordagem feita consiste na descrição das características do agente responsável, mecanismos implicados no processo de infecção, manifestações clínicas, diagnóstico, tratamento e prevenção.

II. Desenvolvimento

1. Ecologia do género *Aspergillus*

Aspergillus é um género composto por fungos filamentosos, ubiqüitário, sobretudo cosmopolita, de distribuição mundial e com um grande impacto social e económico (Prakash & Jha, 2014; Samson *et al.*, 2014).

Aspergillus é composto por mais de 200 espécies, sendo que apenas 20 parecem ser causadoras de infeções oportunistas no Homem (Prakash & Jha, 2014). *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) é a espécie que surge em primeiro lugar como mais vezes identificada, e é seguida por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* e menos frequentemente por *Aspergillus nidulans* (Tabela 1) (Binder & Lass-Flörl, 2013; Paulussen *et al.*, 2016).

Tabela 1 – Principais espécies potencialmente patogénicas de *Aspergillus* e a sua prevalência. Retirado e adaptado de (Steinbach *et al.*, 2012).

Espécie	Nº de amostras isoladas	%
<i>A. fumigatus</i>	543	72,6
<i>A. flavus</i>	74	9,9
<i>A. niger</i>	65	8,7
<i>A. terreus</i>	32	4,3
<i>A. nidulans</i>	3	0,4

Aspergillus fumigatus é a espécie mais comum nas infeções pulmonares. Já *Aspergillus flavus* está mais associado a sinusites alérgicas, aspergiloses pós operatórias e queratites fúngicas. A aspergilose invasiva é causada muitas vezes por *Aspergillus terreus* e *Aspergillus niger*, sendo que este último também é um importante responsável pela colonização do trato respiratório (Kosmidis & Denning, 2015).

Algumas infeções atribuídas às principais espécies de *Aspergillus*, na realidade podem ser causadas por espécies crípticas. As espécies crípticas são aquelas que são morfologicamente indistinguíveis e por isso são usados métodos moleculares para as

identificar. Os termos, complexo e secção, referem-se aos grupos de espécies relacionadas entre si, principalmente pelas suas semelhanças morfológicas. Nestes casos é muito comum existirem resistências aos antifúngicos o que aumenta a necessidade da correta identificação destas espécies (Howard, 2014). Sabino *et al.* (2014) constatou que em Portugal 19,3% das espécies, isoladas a partir de amostras de doentes, eram crípticas. Os complexos encontrados foram *Fumigati* (50,9%), *Flavi* (21%), *Nigri* (15,8%), *Terrei* (5,3%), *Nidulantes* (3,6%) e *Versicolores* (3,6%). As espécies crípticas identificadas pertenciam aos complexos: *Nigri* (*A. awamorii*, *A. brasiliensis* e *A. tubingensis*); *Versicolores* (*A. fructus* e *A. sydowii*); *Fumigati* (*A. lentulus*) e *Nidulantes* (*Emericella echinulata*).

A maioria das espécies de *Aspergillus* reproduz-se assexuadamente. Ainda assim, existem algumas espécies que têm a capacidade de se reproduzir sexuadamente. Esse estado sexual é conhecido como teleomorfo. Para isso, essas espécies possuem uma estrutura, esférica e fechada, denominada cleistotécio, onde se encontram os ascos, responsáveis pela produção dos seus esporos, os ascósporos. O cleistotécio varia em tamanho, cor e forma entre diferentes espécies. Quando essa estrutura se rompe, são libertados os ascos, que na maioria das vezes contêm 8 esporos (Gugnani, 2003).

Porém é a sua forma de reprodução assexuada cuja morfologia é muito característica e que permite a sua identificação (Figura 1 e 2).

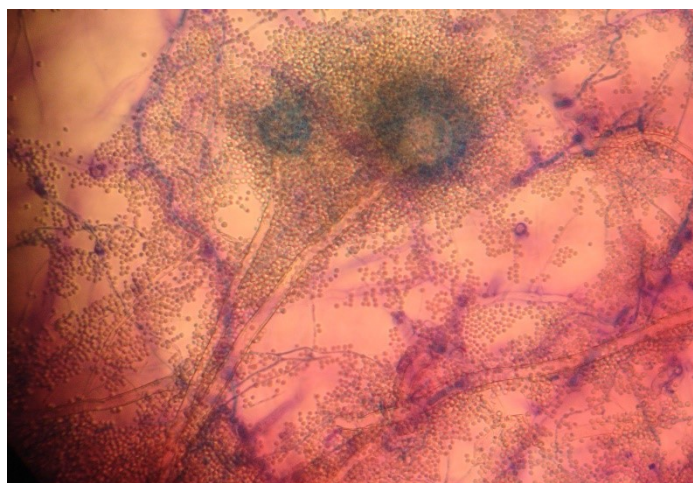


Figura 1 – Observação microscópica de *Aspergillus* spp. Ampliação total de 400x.

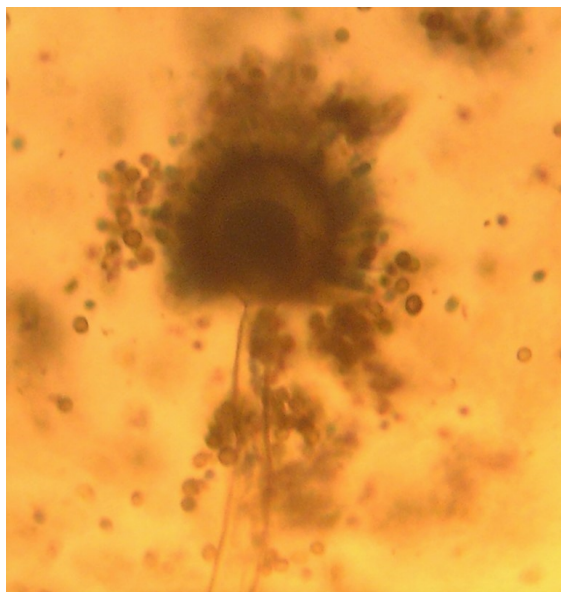


Figura 2 – Observação microscópica da estrutura de *Aspergillus* spp. Ampliação total de 400x.

Microscopicamente é possível observar que é composto por uma vesícula suportada por uma estrutura perpendicular a um eixo axial. Essa estrutura perpendicular consiste numa hifa aérea, denominada de conidióforo, que se desenvolve a partir da “célula pé”, ligada às restantes hifas. As hifas são septadas e hialinas, característica comum a todas as espécies. O conidióforo termina com a formação, no seu ápex, de uma vesícula, muito típica do género *Aspergillus*, a partir do qual cresce uma camada de células chamadas fiálides, que podem ser unisseriadas, estando fixadas directamente à vesícula, ou bisseriadas, se são suportadas por uma outra camada de células, métulas. Consoante cobrem completamente a vesícula ou apenas a parte superior, vão formar uma cabeça radial ou colunar, respectivamente. As fiálides são produtoras de esporos também conhecidos como conídios ou conidiósporos. O tamanho e a forma de todas estas estruturas podem ser semelhantes ou variar ligeiramente de espécie para espécie (Tabela 2) (Prakash & Jha, 2014).

Tabela 2 – Características microscópicas dos fungos do género *Aspergillus*. Retirado e adaptado de (Prakash & Jha, 2014).

Espécie	Conidióforo	Vesícula
<i>A. fumigatus</i>	Curto (<300 µm), incolor ou esverdeado	Redonda, colunar
<i>A. flavus</i>	Incolor	Redonda, radial
<i>A. niger</i>	Comprido, incolor ou castanho	Redonda, radial
<i>A. nidulans</i>	Curto (< 250 µm), incolor	Redonda, colunar
<i>A. terreus</i>	Curto (<250 µm), incolor	Redonda, colunar

Os conídios do *Aspergillus fumigatus* têm entre 2 a 3 µm, enquanto outras espécies de *Aspergillus* como *A. flavus* produzem conídios maiores. Assim as espécies com conídios mais pequenos conseguem penetrar e permanecer nos alvéolos pulmonares ao contrário das que produzem conídios maiores que são removidos mais facilmente pelo próprio organismo (Binder & Lass-Flörl, 2013). A cor dos esporos é uma das características que permite identificar as diferentes espécies de *Aspergillus* (Figura 3), uma vez que diferentes espécies apresentam colorações diferentes nas suas colónias, como exemplificado na tabela 3. Existem outras características do crescimento das culturas, importantes para distinguir espécies, como a velocidade de crescimento na presença de determinados nutrientes e temperaturas (Prakash & Jha, 2014).

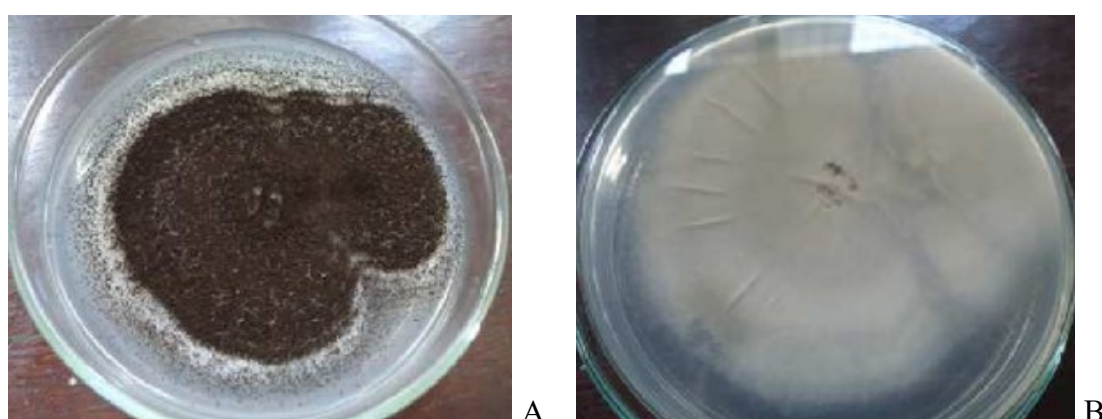


Figura 3 – Aspecto macroscópico de uma cultura de *Aspergillus niger*. (A) Esporos pretos na superfície. (B) Reverso branco. Retirado e adaptado de (Ratnaweera, de Silva, Williams & Andersen, 2015).

Tabela 3 – Coloração das colónias de *Aspergillus spp.* Retirado e adaptado de (Prakash & Jha, 2014).

Espécie	Superfície	Reverso
<i>A. fumigatus</i>	Azul-verde/cinzentos	Branco/cor de pele
<i>A. flavus</i>	Amarelo-verde	Dourado/vermelho vinho
<i>A. niger</i>	Preto	Branco/amarelo
<i>A. nidulans</i>	Verde/amarelo	Vermelho arroxeado/cor de azeitona
<i>A. terreus</i>	Castanho claro/castanho escuro	Branco/castanho

1.1. *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus é o principal agente responsável pela aspergilose invasiva, representando 90% dos casos (Escobar *et al.*, 2016; Lamoth, 2016).

As suas colónias são de textura aveludada e variam entre o azul e o verde-escuro (Cruz, 2014). Os conidióforos são curtos (<300 µm) e as vesículas têm entre 20-30 µm, com fíalides unisseriadas e distribuição colunar (Figura 4). Os conídios são verdes (Gugnani, 2003).

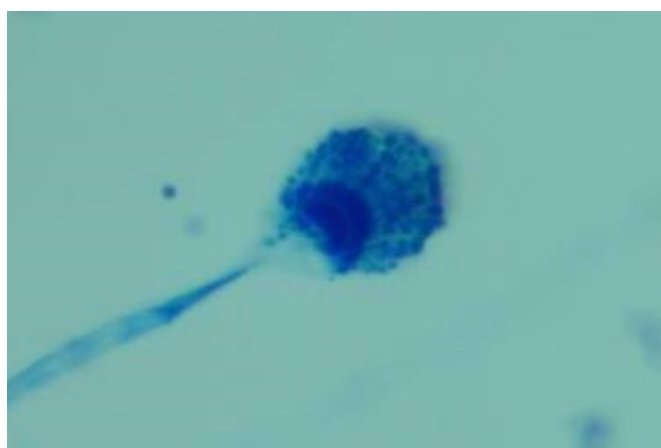


Figura 4 – Observação microscópica de *Aspergillus fumigatus*. Ampliação total de 400x.

A razão pela qual este fungo é mais patogénico que outros do mesmo género ainda não está bem explicada, mas segundo Escobar *et al.* (2016) os conídios de *Aspergillus fumigatus* conseguem ser mais eficientes na penetração do aparelho respiratório, apesar de terem uma capacidade de adesão ao epitélio pulmonar muito semelhante a outras

espécies como por exemplo *A. niger*. O tamanho dos conídios é apresentado como um dos fatores determinantes da sua patogenicidade, uma vez que esta é a espécie cujos esporos têm um menor diâmetro (2-3 μm), podendo facilitar a sua chegada aos alvéolos, que em indivíduos imunocomprometidos facilmente originar infeção (Escobar *et al.*, 2016).

1.2. *Aspergillus flavus*

Para além de ser um relevante patogénico oportunista também é o maior produtor de aflotoxinas em culturas por todo o mundo (Horn, Moore & Carbone, 2009). Assim consegue infetar o Homem não só através da inalação do fungo mas também através da inalação ou ingestão das suas micotoxinas, podendo resultar numa micotoxicose. Uma das micotoxinas é a aflotoxina B1, que é considerada o carcinogénico natural mais potente que se conhece (Murray *et al.*, 2010).

As suas colónias são de cor de azeitona verde a verde amarelado (Cruz, 2014). Os conidióforos podem ter entre 400 e 850 μm de comprimento e as vesículas 20-50 μm de diâmetro. As fíalides podem ser unisseriadas ou bisseriadas dispendo-se de forma radial por toda a superfície (Figura 5) (Gugnani, 2003).

A. flavus apresenta conídios de 4-6 μm , de formato redondo ou elíptico, tornando mais difícil o seu acesso aos alvéolos pulmonares (Escobar *et al.*, 2016).



Figura 5 – *Aspergillus flavus*. 100x. Retirado e adaptado de (Cruz, 2014).

1.3. *Aspergillus niger*

As colónias começam por ser brancas ou amarelas e tornam-se pretas. Os conidióforos são muito longos, podendo chegar aos 3 mm e a vesícula pode ter entre 45 e 75 μm . As fiálides são bisseriadas e cobrem toda a superfície da vesícula. Os conídios são castanhos com um diâmetro de 2,5 a 10 μm (Figura 6) (Gugnani, 2003).

A. niger raramente é responsável por causar infeção invasiva e o seu prognóstico parece ser melhor quando comparado com o prognóstico de infeção causada por outras espécies (Steinbach *et al.*, 2012; Gregg & Kauffman, 2015).



Figura 6 – *Aspergillus niger*. 100x. Retirado e adaptado de (Cruz, 2014).

1.4. *Aspergillus terreus*

As suas colónias são tipicamente cor de café (Cruz, 2014), e os seus conídios medem 2-4 μm de diâmetro, muito semelhante ao tamanho do *fumigatus*, mas menos prevalente a causar infeção (Deak *et al.*, 2009; Escobar *et al.*, 2016). Os conidióforos são curtos, apenas medem entre 100 e 250 μm de comprimento, e as vesículas têm 10-20 μm de diâmetro. As fiálides dão bisseriadas e formam uma cabeça colunar (Figura 7) (Gugnani, 2003). A infeção mais provável de ser causada por esta espécie é a forma invasiva e disseminada (Deak *et al.*, 2009).

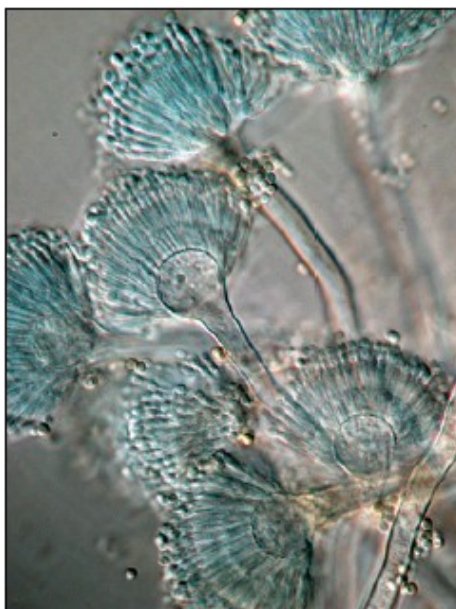


Figura 7 – *Aspergillus terreus*. 100x. Retirado e adaptado de (Cruz, 2014).

Aspergillus terreus tem a característica única de produzir conídios acessórios (Figura 8). Uma estrutura distinta que germina diretamente na hifa. A sua arquitetura, ligeiramente diferente da dos restantes conídios, pode desempenhar um papel importante na virulência deste organismo. A forma como os conídios acessórios influenciam a patogénese desta espécie ainda não está completamente estudada, contudo pensa dever-se à sua rápida germinação, capacidade de adesão aumentada e a um metabolismo mais

ativo. Para além disso a sua membrana celular parece conter menos ergosterol o que pode explicar a sua resistência aos fármacos (Deak *et al.*, 2009).

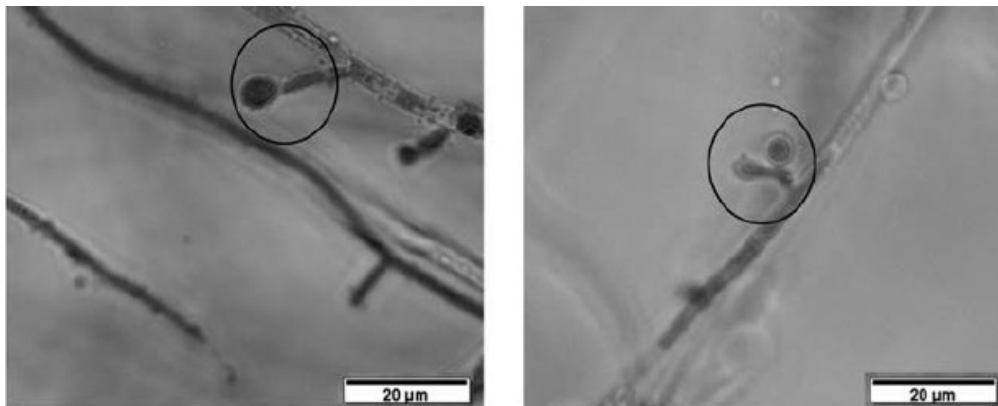


Figura 8 – Conídios acessórios de *Aspergillus terreus*. Barra de escala: 20 µm. Retirado e adaptado de (Deak *et al.*, 2009).

1.5. *Aspergillus nidulans*

As colónias de *A. nidulans* são aveludadas ou poeirentas, de cor verde, verde-escuras ou amarelas. Os conidióforos são acastanhados e as vesículas são de forma hemisférica de 8-10 µm (Figura 9). As fiálides são bisseriadas e os conídios são verdes com 3-4 µm de diâmetro (Gugnani, 2003).

A. nidulans é das espécies potencialmente patogénicas menos vezes identificada mas é muitas vezes reportada como responsável por infeção invasiva em doentes com doença granulomatosa crónica (Bukhari & Alrabiaah, 2009).

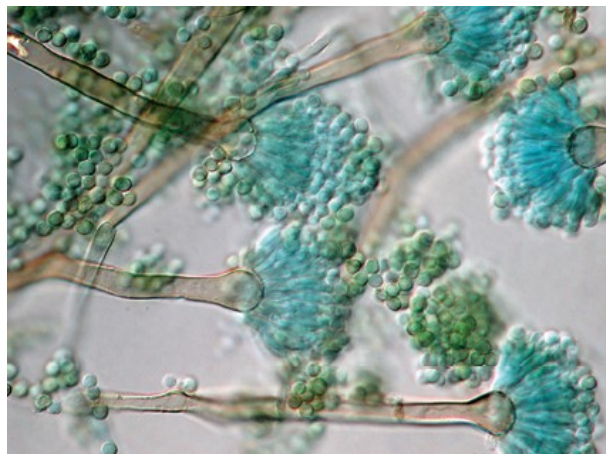


Figura 9 – *Aspergillus nidulans*. 100x. Retirado e adaptado de (Cruz, 2014)

2. Epidemiologia

O género *Aspergillus* distribui-se mundialmente e em vários habitats (Samson *et al.*, 2014). É possível encontrar a maioria das espécies presentes na água, solo, pó, comida e em vegetação em decomposição (Gregg & Kauffman, 2015; Paulussen *et al.*, 2016). Também podem estar presentes em superfícies, no ar, no pó e na comida em ambientes interiores, como a nossa casa (Paulussen *et al.*, 2016), ou ambientes hospitalares, que também são uma grande fonte de *Aspergillus*, e onde os sistemas de ventilação agravam a sua propagação (Sabino *et al.*, 2014).

Um estudo realizado em Portugal (Sabino *et al.*, 2014) analisou um conjunto de amostras recolhidas de diferentes fontes, de forma a estudar a distribuição das diferentes espécies de *Aspergillus*. Essas fontes incluíam, entre outras, um hospital, cujas amostras foram recolhidas do ar e das superfícies de várias unidades, e doentes em instituições de saúde. Segundo os seus dados, nas amostras recolhidas no meio hospitalar, detetaram uma maior variedade de espécies em comparação às restantes fontes. Neste estudo, o complexo de *A. fumigatus* foi o mais isolado nas amostras recolhidas de doentes colonizados (50,9%) mas apenas o quarto mais isolado nas amostras recolhidas no ambiente hospitalar (8,8%).

Aspergillus é um dos responsáveis por mais de 90% das mortes notificadas como causadas por fungos, juntamente com *Cryptococcus*, *Candida* e *Pneumocystis*. Estima-se que ocorram mais de 200,000 casos de aspergilose por ano no mundo, com uma mortalidade que varia entre 30 e 95% (Brown *et al.*, 2012). Estudos demonstram que o foco de infeção mais comum é o pulmão, sendo que em 76% dos doentes é o único foco de infeção e 10% dos doentes apresentam evidência em mais que um local de infeção (Steinbach *et al.*, 2012).

As infeções causadas por *Aspergillus* são uma ameaça principalmente para os indivíduos imunodeprimidos. A imunossupressão caracteriza-se pela diminuição da atividade ou eficácia do sistema imunitário, e acontece muitas vezes como um efeito adverso a terapêuticas dirigidas a outras patologias. Noutros casos, é vantajoso debilitar propositadamente o sistema imunitário, sobretudo através de fármacos, denominados de imunossupressores, cada vez mais usados na prática clínica (Rathee, Chaudhary, Rathee, Rathee & Kumar, 2013).

Esta infecção está muitas vezes associada a certos grupos de doentes como doentes neutropénicos, transplantados alogénicos de células tronco hematopoiéticas, transplantados de órgãos, cancro hematológico e doentes com imunodeficiência congénita ou adquirida (Herbrecht, Bories, Moulin, Ledoux & Letscher-Bru, 2012; Patterson *et al.*, 2016). Mas o tratamento dado para a condição subjacente do doente pode ser tão decisivo como a doença em si. Corticosteróides, inibidores da calcineurina, anticorpos monoclonais inibidores das células T, globulinas antitimocíticas entre outros, são um fator de risco para a aspergilose e para infeções fúngicas no geral (Herbrecht *et al.*, 2012). Ainda podem estar implicados outros fatores de risco como queimaduras, traumas, insuficiência renal e diabetes (Herbrecht *et al.*, 2012). Nos últimos tempos tem surgido infecção em doentes nas unidades de cuidados intensivos, tradicionalmente não considerados uma de população de risco (Gregg & Kauffman, 2015).

A aspergilose invasiva continua a aumentar e segundo os dados mais recentes da PATH Alliance® a aspergilose invasiva é a infeção fúngica mais comum em transplantados de células tronco hematopoiéticas (Azie *et al.*, 2012).

Vários estudos vieram demonstrar que os principais grupos de doentes em risco afetados pela aspergilose são os transplantados de células tronco hematopoiéticas e os doentes de cancro hematológico (Cornely *et al.*, 2007; Azie *et al.*, 2012).

As tabelas 4 e 5 mostram a incidência que esta infeção demonstrou ter entre os diferentes tipos de transplantes e doenças cancerígenas, respetivamente.

Tabela 4 – Incidência de aspergilose invasiva em doentes sujeitos a transplantes. Retirado e adaptado de (Herbrecht *et al.*, 2012).

Transplante	Incidência (%)
Alogénico de células tronco hematopoiéticas	2,7-23
Autólogo de células tronco hematopoiéticas	0,5-6
Pulmão ou coração e pulmão	3-26
Coração	0,4-15
Fígado	0,7-10
Pâncreas	1,1-2,9
Rim	0,2-1
Intestino delgado	0-11

Tabela 5 – Incidência de aspergilose invasiva em doentes de cancro. Retirado e adaptado de (Herbrecht *et al.*, 2012).

Cancro	Incidência (%)
Leucemia mielóide aguda	5-24
Leucemia mielóide linfoblástica	3,8
Mieloma múltiplo	2-3
Linfoma não-Hodgkin	0,8
Linfoma de Hodgkin	0,4
Cancro do pulmão	2,6

A taxa de sobrevivência é variável consoante a população de risco. Segundo o estudo de Steinbach *et al.* (2012) os transplantados de órgãos sólidos são a população com a melhor taxa de sobrevivência. A taxa de sobrevivência dos transplantes de órgãos (77,9%) superou os pacientes com cânceres hematológicos (59,6%), tumores sólidos (60,5%) e pacientes submetidos a transplante de células tronco hematopoiéticas (62,4%) (Figura 10).

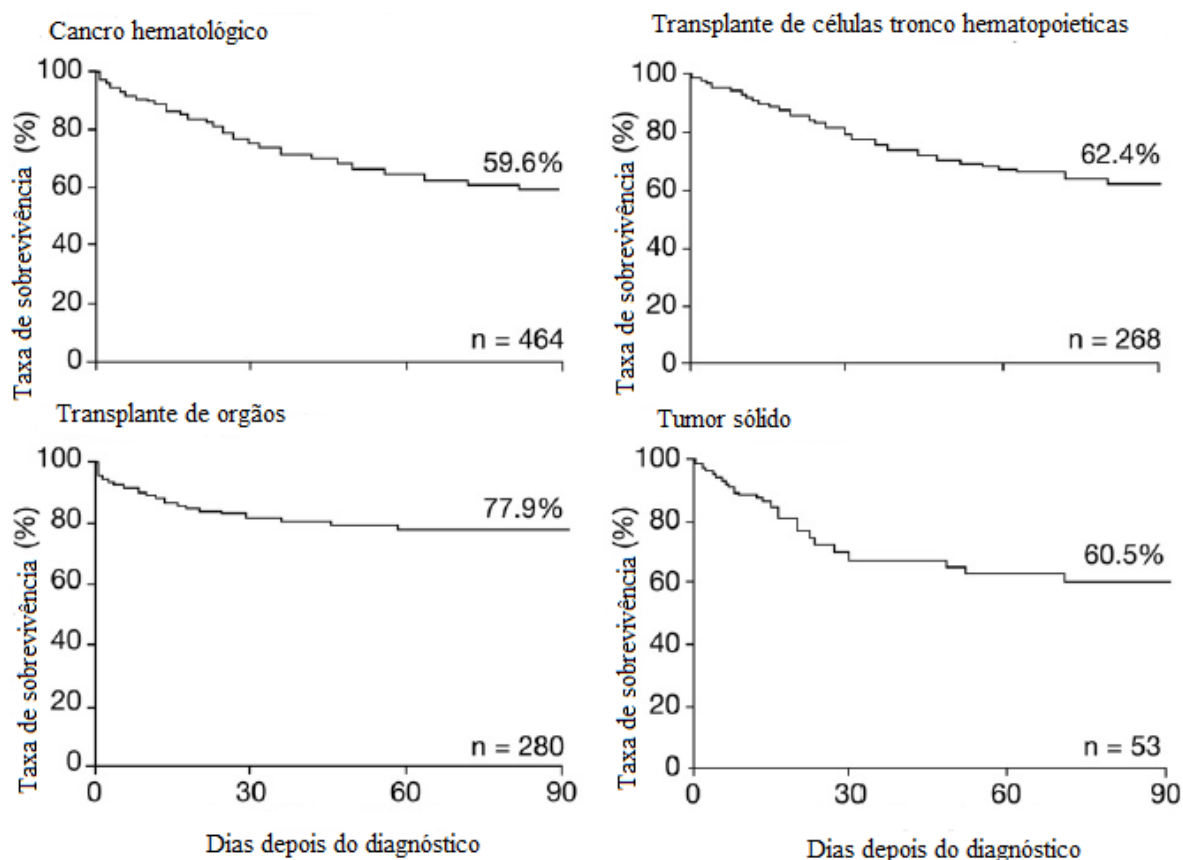


Figura 10 – Taxa de sobrevivência por população de risco. Retirado e adaptado de (Steinbach *et al.*, 2012).

No geral, a aspergilose tem uma grande morbidade e mortalidade associada mas a crescente capacidade de diagnóstico e maior eficácia dos agentes antifúngicos têm contribuído para a diminuição desses indicadores (Patterson & Strek, 2014). Nas últimas décadas a mortalidade diminuiu de 80-90% para 40-50%, em alguns grupos de pacientes (Gregg & Kauffman, 2015).

3. Fatores fúngicos implicados na aspergilose

Muitos estudos se têm efetuado sobre a patogenicidade de *Aspergillus*, contudo ainda existem fatores implicados na aspergilose que precisam de ser explicados. No entanto, sabe-se que a patogénese de *Aspergillus* é um processo multifatorial (Dagenais & Keller, 2009; Steinbach, 2013). Está diretamente dependente de fatores relacionados com o fungo e fatores relacionados com o hospedeiro.

Aspergillus apresenta características intrínsecas que contribuem para a sua patogenicidade. O tamanho mais pequeno dos conídios de algumas espécies permite um acesso mais fácil aos alvéolos. A termotolerância de *A. fumigatus*, uma vez que consegue crescer a temperaturas entre 37 e 50°C, faz com que seja muito resistente. Para além disso, *Aspergillus* produz várias enzimas, nomeadamente proteases, hidrolases e elastases (Garcia-Vidal, Viasus & Carratalà, 2013). As enzimas proteolíticas, incluindo as proteases de serina, as metaloproteases e proteases aspárticas, degradam os tecidos do hospedeiro facilitando a sua invasão (Paulussen *et al.*, 2016).

A parede celular fúngica é uma barreira com o papel principal de proteção e sobrevivência da célula, mas também é importante para ligação e invasão do epitélio do hospedeiro. A sua estrutura é rica em polissacáridos, principalmente, em mananos, manoproteínas e β -1,3-glucanos, que ligam a quitina e o galactomanano e formam padrões moleculares associados a patogénicos (PAMPs). Os PAMPs são responsáveis por ativar a resposta imunitária (Chotirmall *et al.*, 2014).

A superfície dos conídios de *A. fumigatus* é revestida por uma camada, a “rodlet layer”, composta por proteínas hidrofóbicas, RodA, ligadas covalentemente à parede celular. Esta camada superficial facilita a propagação dos conídios, mas mais importante que isso, é responsável por mascarar o seu reconhecimento pelo sistema imunitário e consequentemente impedir uma resposta imunitária (Aimanianda *et al.*, 2009).

O ferro é um nutriente essencial para *Aspergillus*, incluindo para a síntese do ergosterol e para o mecanismo de resistência aos azóis, e na sua carência, este fungo produz sideróforos para quelatar o ferro extracelular. Está descrita uma relação entre este mecanismo e a sua virulência (Haas, 2012).

3.1. Fatores de virulência

A redundância de genes com as mesmas funções, os efeitos pleiotrópicos de alguns genes e os aglomerados de genes conhecidos como “clusters”, resultam numa certa dificuldade em identificar os determinantes de virulência de *Aspergillus*. Segundo a definição clássica de fatores de virulência, que engloba genes que afetam a virulência mas são dispensáveis para o seu crescimento, *Aspergillus* apenas possui duas moléculas que cumprem essa condição, a melanina e a gliotoxina (Sugui, Kwon-Chung, Juvvadi, Latgé & Steinbach, 2013).

Estudos recentes revelam que a dihidroxinaftaleno-melanina (DHA), constituinte da parede celular fúngica, confere uma maior capacidade de sobrevivência aos conídios que sofrem fagocitose pelos neutrófilos e macrófagos alveolares. Os conídios são capazes de alterar a funcionalidade dos fagolisossomas e inibir o processo de acidificação, o que faz com que consigam resistir à digestão pelas enzimas do lisossoma (Thywißen *et al.*, 2011; Amin, Thywissen, Heinekamp, Saluz & Brakhage, 2014).

O outro mecanismo de virulência de *Aspergillus* é a produção de toxinas, consideradas de metabolitos secundários. As principais micotoxinas produzidas por *A. fumigatus* são a gliotoxina, a fumagilina, o ácido helvolico, fumitremorgina A e hemolisina Asp. A mais relevante é a gliotoxina (Paulussen *et al.*, 2016). A gliotoxina modifica a resposta imunitária e induz a apoptose de vários tipos de células. A sua toxicidade é atribuída à integridade de uma ponte de dissulfeto da molécula (Figura 11) e a sua atividade imunossupressora afeta a circulação dos neutrófilos e inibe a fagocitose (Scharf *et al.*, 2012).

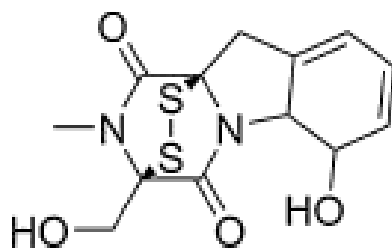


Figura 11 – Estrutura química da gliotoxina. Retirado e adaptado de (Chotirmall *et al.*, 2014).

4. Fatores do hospedeiro favorecedor da aspergilose

Os fatores relacionados com o hospedeiro também desempenham um papel muito importante como causa da aspergilose. Como dito anteriormente *Aspergillus* é um fungo oportunista e raramente patogénico em hospedeiros imunocompetentes, uma vez que o sistema imunitário elimina o agente agressor e previne uma possível infeção (Paulussen *et al*, 2016). Naturalmente, quando o sistema imunitário se encontra num estado de supressão, como no caso de terapêutica imunossupressora, o hospedeiro torna-se suscetível de desenvolver infeção (Rathee *et al.*, 2013; Warris, 2014).

4.1. Terapêutica imunossupressora

Os avanços das terapêuticas imunossupressoras têm aumentado a população de risco e consequentemente a prevalência da aspergilose pulmonar (Patterson & Strek, 2014; Ravikumar, Win & Chai, 2015).

Os imunossupressores são substâncias exógenas que inibem o sistema imunitário. A maioria dos imunossupressores visa a inibição da estimulação, activação e proliferação das células T (Malat & Culkin, 2016). São usados para controlar reações de hipersensibilidade graves, como a asma, doenças auto-imunes, como por exemplo a artrite reumatóide e doença de Crohn e após transplantes para prevenir a rejeição dos órgãos. O primeiro imunossupressor a ser identificado foi a cortisona, seguido pela descoberta da azatioprina, em 1959, e da ciclosporina em 1970 (Rathee *et al.*, 2013). Muitos outros têm surgido ao longo dos anos (Tabela 6) (Malat & Culkin, 2016).

Tabela 6 – A evolução dos imunossupressores ao longo dos anos. Retirado e adaptado de (Malat & Culkin, 2016).

1990 – 1994	Ciclosporina (modificada)
	Tacrolímus
	Micofenolato de mofetil
1995 – 1999	Sirolímus
	Globulina Antitimocítica
	Daclizumab
	Basiliximab
2005 – 2010	Micofenolato sódico
	Everolímus
2010 – 2015	Belatacept
	Tacrolímus (cápsulas de liberação prolongada)
	Tacrolímus (comprimidos de liberação prolongada)

Os principais imunossupressores utilizados são:

- Glucocorticóides
- Inibidores da calcineurina
- Agentes antiproliferativos
- Anticorpos
- Outros

Glucocorticóides

Os glucocorticóides, corticosteróides ou esteróides, são usados desde os primeiros tempos do transplante de órgãos, como é o caso da prednisolona ou dexametasona (Chen *et al.*, 2014). Em doses altas são muito tóxicos para a linhagem linfóide, mas em doses baixas os glucocorticóides são imunossupressores e anti inflamatórios provocando uma diminuição da produção de citocinas. A dose e a duração do tratamento dependem da doença (Rathee *et al.*, 2013). São agentes imunossupressores de primeira linha e por isso estão presentes na maioria dos regimes de terapêuticas imunossupressoras (Zdanowicz, 2009; Rathee *et al.*, 2013).

O seu mecanismo de ação consiste na inibição da transcrição de genes nomeadamente a inibição da translocação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) para o núcleo (Malat & Culkin, 2016). Os glucocorticóides suprimem a imunidade celular, inibindo os genes codificadores das citocinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e TNF- γ). A diminuição da produção de citocinas vai levar a uma diminuição da proliferação das células T. Os corticóides também suprimem a imunidade humoral, diminuindo a expansão de células B e a síntese de anticorpos (Rathee *et al.*, 2013). Os glucocorticóides também têm a capacidade de inibir a transcrição da ciclo-oxigenase 2 e ativar proteínas, como a lipocortina-1 e a fosfatase MAPK, inibindo assim a fosfolipase A₂ citosólica (Zdanowicz, 2009).

Os seus efeitos adversos mais comuns são aumento de apetite, voz rouca e transpiração. Mais raramente podem causar distúrbios psiquiátricos agudos, como agitação, agressividade e psicose. A longo prazo estes fármacos podem provocar efeitos adversos irreversíveis, como Síndrome de Cushing, hipertensão, diabetes, cataratas, úlcera péptica e osteopenia (Rathee *et al.*, 2013). Estes efeitos secundários fazem com que, por vezes, a terapêutica com corticosteróides seja utilizada pelo período de tempo mais curto possível (Malat & Culkin, 2016).

Inibidores da calcineurina

O seu mecanismo de ação consiste na inativação da calcineurina e consequente inibição da transcrição de IL-2, reduzindo a função das células T (Zdanowicz, 2009; Malat & Culkin, 2016).

O primeiro inibidor da calcineurina disponível foi a ciclosporina. O tacrolímus só foi aprovado 10 depois. A monitorização desta medicação é uma parte importante do tratamento devido à sua toxicidade e margem terapêutica estreita. A complicação mais comum e também mais grave é a nefrotoxicidade. Pensa-se que a ciclosporina tenha mais efeitos metabólicos, como hipertensão, hipercolesterolemia e hiperuricemia, enquanto o tacrolímus seja mais diabetogénico e neurotóxico, mas no geral, ambos são parecidos em termos de efeitos adversos e interações medicamentosas (Malat & Culkin, 2016).

A ciclosporina, isolada a partir do fungo *Tolypocladium inflatum*, foi aprovada em 1983 e é amplamente utilizada desde então. A ciclosporina forma um complexo com a ciclofilina (uma imunofilina dos linfócitos) que inibe a calcineurina, responsável pela transcrição normal da IL-2 e pelo funcionamento normal dos linfócitos T. A sua marcada nefrotoxicidade faz com que a sua utilização tenha vindo a ser substituída por imunossupressores mais recentes (Rathee *et al.*, 2013).

O tacrolímus é um macrólido obtido a partir da bactéria *Streptomyces tsukubaensis*. É muito utilizado no transplante de fígado e rim, sendo que por vezes também é usado em transplantes de coração e pulmão (Rathee *et al.*, 2013). O tacrolímus é mais potente que a ciclosporina (Zdanowicz, 2009; Rathee *et al.*, 2013; Malat & Culkin, 2016).

Agentes antiproliferativos

Estes fármacos inibem a divisão celular, nomeadamente dos linfócitos B e dos linfócitos T. São mais usados como antineoplásicos mas também são indicados como imunossupressores, em doses menores. Incluem os agentes alquilantes, os antimetabolitos e os antibióticos citotóxicos (Rathee *et al.*, 2013).

- Antimetabolitos

Os antimetabolitos interferem com a síntese dos ácidos nucleicos, análogos da purina, análogos da pirimidina e análogos do ácido fólico.

A azatioprina é um pró-fármaco da mercaptopurina e foi o primeiro imunossupressor usado em transplantes. Interfere com o metabolismo dos análogos das purinas e inibe a síntese do DNA (Zdanowicz, 2009; Rathee *et al.*, 2013).

O uso da azatioprina tem vindo a ser substituído pelo micofenolato, cujo mecanismo de ação é semelhante, inibindo a síntese das bases purinas do DNA. O uso do micofenolato exige uma ponderação redobrada junto dos pacientes do sexo feminino, devido ao seu risco teratogénico (Malat & Culkin, 2016).

O metotrexato é um análogo do ácido fólico. Liga-se à enzima dihidrofolato redutase e impede a síntese do tetrahydrofolato. É usado no tratamento de doenças autoimunes e transplantes (Rathee *et al.*, 2013).

Os efeitos secundários dos antimetabolitos são principalmente hematológicos, nomeadamente citopénias profundas. Para além disso, a azatioprina causa anemia macrocítica, que deve ser monitorizada e o micofenolato provoca vários efeitos gastrointestinais, como náuseas, vómitos e diarreia, que podem ser minimizados como ajuste da dose (Malat & Culkin, 2016).

- Inibidores do mTOR

mTor é uma proteína citosólica, ativada pela IL-2, interveniente na regulação de várias proteínas envolvidas na proliferação das células T (Zdanowicz, 2009).

O sirolímus foi o primeiro imunossupressor aprovado desta classe (Malat & Culkin, 2016). O sirolímus é produzido a partir de *Streptomyces hygroscopicus* e apesar de ter uma estrutura semelhante ao tacrolímus, atua de maneira diferente e por conseguinte tem efeitos secundários diferentes. Liga-se ao mesmo ao mesmo recetor mas, ao contrário do tacrolímus, esse complexo não inibe a calcineurina, inibe a mTOR. Inibe a proliferação dos linfócitos T e impede a diferenciação das células B, diminuindo a produção de anticorpos. É utilizado como profilaxia da rejeição de órgãos em doentes adultos transplantados renais com um risco imunológico ligeiro a moderado (Rathee *et al.*, 2013).

O seu poder antiproliferativo resulta na diminuição da capacidade de cicatrização de feridas, o que é necessário ter em conta antes de qualquer procedimento médico ou cirúrgico (Malat & Culkin, 2016).

Anticorpos

A utilização de anticorpos é uma maneira rápida e potente método de imunossupressão (Rathee *et al.*, 2013). Os anticorpos ligam-se a recetores, epítopos, nos linfócitos e a sua classificação é feita com base no número de ligações que têm como alvo. Os anticorpos policlonais têm vários epítopos alvo enquanto os anticorpos monoclonais apenas se ligam a um recetor (Malat & Culkin, 2016). O seu forte efeito imunossupressor faz com os anticorpos apenas sejam usados na indução da terapêutica e no tratamento da rejeição (Zdanowicz, 2009; Malat & Culkin, 2016).

Um dos anticorpos policlonais mais utilizados é a globulina antitimocítica (Malat & Culkin, 2016). Os anticorpos policlonais atuam nos linfócitos T, inibindo-os e causando a sua lise. Assim inibem as reações da imunidade mediada por células, como é o exemplo rejeição de enxertos, reações de hipersensibilidade e doença do enxerto contra o hospedeiro.

A maioria dos pacientes tem uma reacção aguda ao tratamento, incluindo febre, arrepios e anafilaxia. Alguns ainda desenvolvem mais tarde “serum sickness” e glomerulonefrite imunitária complexa. Os doentes desenvolvem uma resposta imunitária e o efeito desta terapêutica vai diminuindo gradualmente com o seu uso (Rathee *et al.*, 2013).

Os anticorpos monoclonais são direccionados para um antígeno estritamente definido. Os mais importantes são os anticorpos anti-CD3 e anti-IL-2. São usados para prevenir a rejeição de órgãos transplantados e para localizar alterações nas populações de linfócitos. Basiliximab e Daclizumab são exemplos de anticorpos monoclonais direccionados o recetor IL-2. São usados como indução da terapêutica em transplantes (Rathee *et al.*, 2013). Outro exemplo é o Rituximab, que tem como alvo a proteína CD20, provocando a lise das células B. As células B são importantes reconhecedoras de antígenos, para além de produzirem anticorpos (Malat & Culkin, 2016).

Os anticorpos monoclonais causam menos efeitos secundários (Rathee *et al.*, 2013). A imunossupressão, causada pela lise dos linfócitos, é o principal efeito, podendo dar a origem a infeções como consequência. Por vezes também pode causar neutropenia e trombocitopenia (Malat & Culkin, 2016).

4.2. Resposta imunitária

O Homem está exposto diariamente a uma grande quantidade de esporos de *Aspergillus* contudo também está protegido pelo sistema imunitário e os seus componentes, cujo papel é fundamental na prevenção da colonização pulmonar e do desenvolvimento de infecção pelo fungo (Chotirmall *et al.*, 2013; Margalit & Kavanagh, 2015). Num indivíduo imunocompetente, um contacto com os esporos faz desencadear, em primeiro lugar, o sistema imunitário inato (Chotirmall *et al.*, 2014). Os componentes envolvidos são: as barreiras anatómicas do trato respiratório, as células fagocitárias ou fagócitos, péptidos antimicrobianos e recetores de reconhecimento de padrões (Chotirmall *et al.*, 2013; Chotirmall, Mirkovic, Lavelle & McElvaney, 2014). Estas defesas têm a capacidade de limitar a germinação dos esporos em hifas invasoras e reduzir os danos nos tecidos infetados (Cramer, Rivera & Hohl, 2011).

O primeiro contacto com o qual, *Aspergillus* interage com o hospedeiro são as **barreiras anatómicas**, incluindo o epitélio e as secreções do sistema respiratório (Heinekamp *et al.*, 2015; Margalit & Kavanagh, 2015). Os conídios, assim que são inalados, depositam-se nas paredes das vias aéreas, ficam presos no muco e são facilmente removidos do trato respiratório a partir da limpeza mucociliar, tosse ou espirros. Os conídios de algumas espécies de *Aspergillus* são tão pequenos que conseguem sobreviver às barreiras anatómicas e chegar aos alvéolos. Nestes casos torna-se necessário que sejam ativados outros mecanismos de defesa, como a fagocitose (Chotirmall *et al.*, 2013). A **fagocitose** é o processo através do qual os esporos são eliminados pelas células fagocitárias, designadamente neutrófilos e macrófagos. Os macrófagos são muito importantes na defesa contra *Aspergillus* uma vez que são as primeiras células a atuar contra o fungo (Morton *et al.*, 2012; Chotirmall *et al.*, 2013). Os macrófagos alveolares asseguram que os conídios não chegam a germinar (Margalit & Kavanagh, 2015). Também são responsáveis por desencadear uma cascata inflamatória e consequente libertação de citocinas como TNF α e IL-8 (Chotirmall *et al.*, 2014). Quando os conídios conseguem germinar, tornam-se alvo dos neutrófilos, que os conseguem facilmente identificar (Margalit & Kavanagh, 2015). Os neutrófilos iniciam o processo de fagocitose e libertam o conteúdo enzimático dos seus grânulos levando à morte dos esporos (Chotirmall *et al.*, 2013).

As células do sistema respiratório produzem **moléculas antimicrobianas**, que atuam diretamente como antibióticos ou indiretamente facilitando a fagocitose, na tentativa de manter os pulmões estéreis (Balloy & Chignard, 2009). Os péptidos antimicrobianos (AMPs) são moléculas endógenas, que desempenham um papel muito importante no controlo de infeções fúngicas, nomeadamente de *A. fumigatus*. Entre eles encontram-se as defensinas, catelicidinas, inibidores da leucoprotease secretória e lactoferrina (Chotirmall *et al.*, 2013). As defensinas são um dos grupos de AMPs responsáveis pela destruição de *Aspergillus*. São moléculas catiónicas e o seu mecanismo de ação consiste na lise da célula fúngica através da rutura da sua membrana. As α -defensinas são sintetizadas nos grânulos dos neutrófilos enquanto as β -defensinas são sintetizadas pelas células epiteliais. Outro grupo de AMPs são as catelicidinas, mas que apenas contém uma catelicidina humana, LL-37 (de Smet & Contreras, 2005). A lactoferrina, cuja produção é feita pelos neutrófilos e pelas células epiteliais, liga-se ao ferro diminuindo a sua disponibilidade para o crescimento de *Aspergillus*. O sistema imunitário inato também possui recetores reconhecedores dos conídios de *Aspergillus*, denominados de **recetores reconhecedores de padrões** (PRRs), incluindo recetores “toll-like” (TLRs) e “dectin-1”. Este reconhecimento é feito através de componentes na superfície da parede celular fúngica, como β -glucano, quitina, manano e galactomanano (Chotirmall *et al.*, 2013). Estes recetores atuam como opsoninas, facilitando a ligação entre as células fagocitárias e os agentes patogénicos, permitindo assim a sua eliminação (Balloy & Chignard, 2009). Os PRRs podem ser solúveis ou associados a células. O PRRs solúveis mais importantes contra *Aspergillus* são os recetores de lectina tipo C (CLRs) e pentraxin-3 (PTX-3) e os PRRs associados a células mais importantes são CLRs, TLRs e recetores “NOD-like” (NLRs) (Garcia-Vidal *et al.*, 2013).

Contudo, para que a resposta imunitária do hospedeiro seja eficiente é necessário uma interação coordenada e sinérgica entre o sistema imunitário inato e o sistema imunitário adquirido (Chotirmal *et al.*, 2014). As células dendríticas são um exemplo de um importante elo de ligação entre ambos, uma vez que são responsáveis por iniciar a **resposta imunitária mediada por células T**. Este processo acontece a partir da libertação de citocinas e consequente exacerbação do sistema imunitário inato. A resposta inicia-se com a diferenciação das células T “helper” (Th) em Th1, Th2, Th17 ou células T reguladoras (Treg). Quando a resposta imunitária é do tipo Th1, estas provocam a produção das citocinas inflamatórias IFN- γ , IL-6 e IL-2.

Por outro lado, a resposta tipo Th2 induz a produção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 (Garcia-Vidal *et al.*, 2013). As células Th1 e Th17 facilitam a activação dos macrófagos e o recrutamento de neutrófilos, respetivamente (Camargo & Husain, 2014).

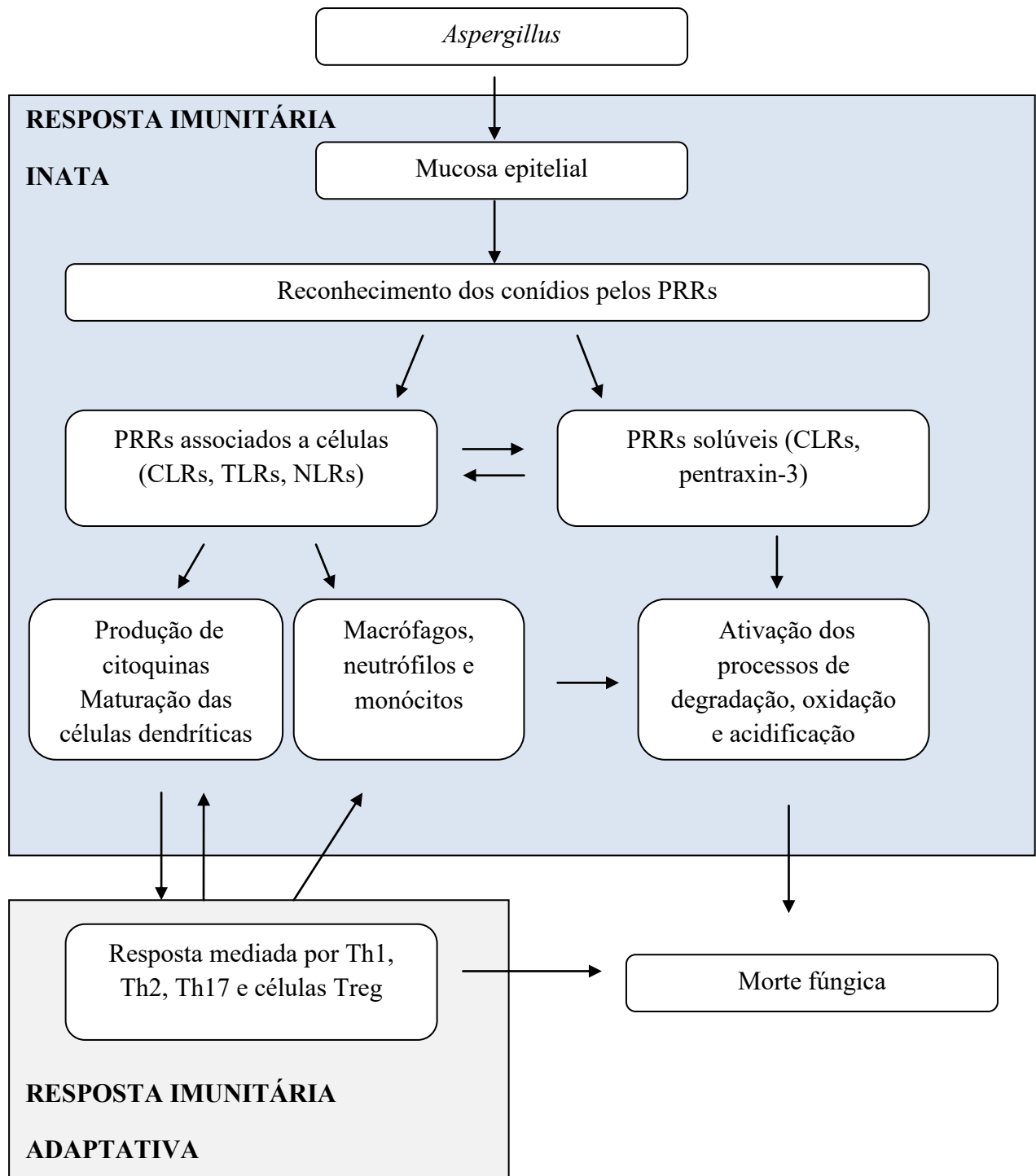


Figura 12 – Esquema representativo da resposta imunitária do hospedeiro à infecção por *Aspergillus*.

Retirado e adaptado de (Garcia-Vidal *et al.*, 2013).

5. Manifestações Clínicas

A aspergilose tem diversas apresentações clínicas, sendo que costuma afetar mais os pulmões e normalmente os sintomas são inespecíficos. A exposição ao agente pode desencadear desde reações de hipersensibilidade, doença superficial, doença invasiva pulmonar ou doença disseminada em indivíduos imunocomprometidos. As condições inerentes ao estado do sistema imunitário do hospedeiro são um ponto-chave para determinar o desenvolvimento da infeção, sendo que face à sua grande capacidade de disseminação pode afetar praticamente qualquer órgão (Cadena, Thompson & Patterson, 2016).

As principais manifestações nos hospedeiros imunossuprimidos são a aspergilose pulmonar crónica, aspergilose invasiva pulmonar e disseminada (Figura 13) (Zmeili & Soubani, 2007; Patterson & Strek, 2014; Schweer *et al.*, 2014).

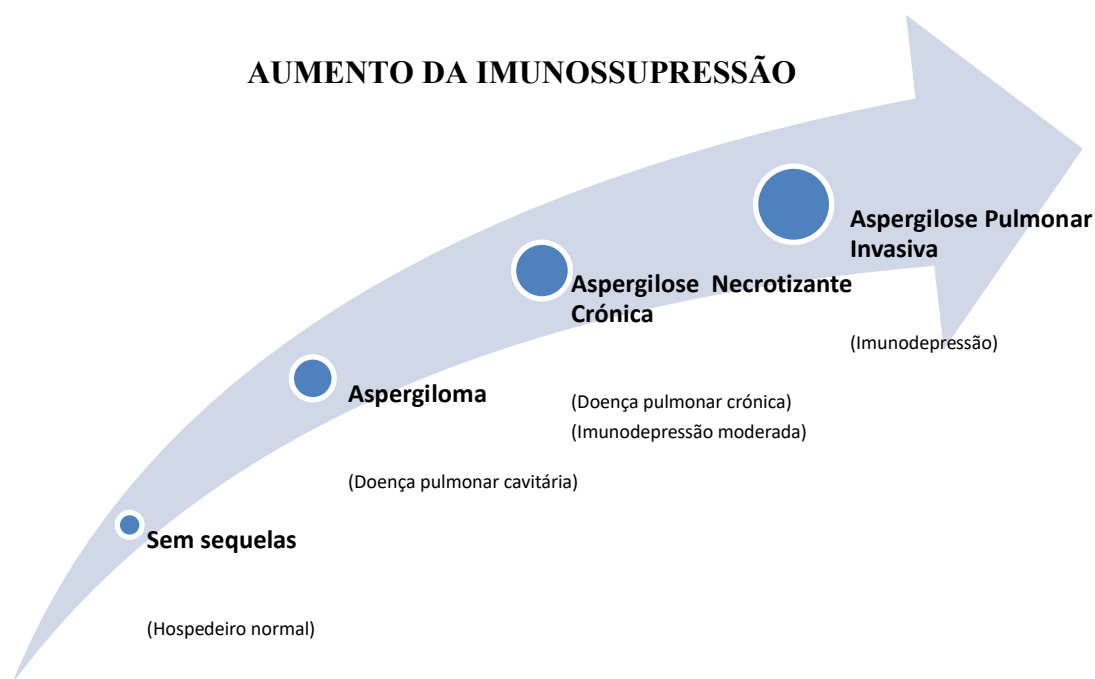


Figura 13 – As diferentes manifestações resultantes do estado imunitário do hospedeiro. Retirado e adaptado de (Zmeili & Soubani, 2007; Thompson & Patterson, 2011).

5.1. Aspergilose pulmonar crónica

A aspergilose pulmonar crónica afeta de uma forma progressiva a cavidade pulmonar, causando sintomas como tosse prolongada e recorrente, dispneia, perda de peso e menos frequentemente, hemoptises e hemorragias pulmonares. Resultado da sua progressão gradual podem desenvolver-se aglomerados de micélios em forma de bolas no pulmão, condição denominada de Aspergiloma (Figura 14) (Schweer et al., 2014).

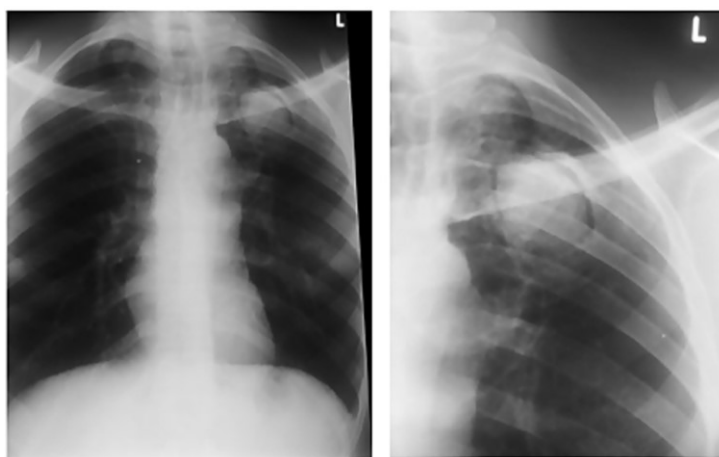


Figura 14 – Radiografia ao tórax mostrando a presença de um Aspergiloma na zona apical do pulmão esquerdo. Retirado e adaptado de (Ofori et al, 2016).

Existem várias manifestações da Aspergilose pulmonar crónica, sendo que as mais comuns são a forma cavitária e a necrotizante. A aspergilose pulmonar cavitária crónica, para além de sintomas pulmonares e sistémicos associados, é caracterizada pela formação de cavidades no pulmão, com ou sem aspergiloma. A aspergilose brônquica pseudomembranosa necrotizante destrói aos poucos o tecido pulmonar (Ohba et al., 2012). A aspergilose necrotizante é uma forma rara de aspergilose e o seu diagnóstico costuma ser tardio uma vez que facilmente se parece com outras infeções pulmonares, como por exemplo, a tuberculose (Chabi *et al.*, 2015).

São doentes com condições pulmonares subjacentes, os mais atingidos por esta doença, como é o caso de DPOC, sarcoidose, infeções por micobactérias. Mas condições de imunossupressão também são um fator desencadeante (Schweer et al., 2014; Kosmidis & Denning, 2015).

5.2. Aspergilose invasiva

A aspergilose invasiva é considerada a infeção fúngica oportunista com o maior risco de vida em doentes imunocomprometidos, sendo que a sua forma mais comum é a aspergilose invasiva pulmonar, implicando a invasão fúngica do tecido pulmonar (Kosmidis and Denning, 2015). Resulta, em grande parte, da falha da desobstrução das vias aéreas, por parte de um sistema imunitário debilitado (Patterson & Streck, 2014).

Esta forma de infeção tem uma grande relevância sobretudo junto de doentes submetidos a quimioterapia, indivíduos neutropénicos, transplante de pulmão, doentes em estado crítico ou sob terapêutica corticosteróide, sendo que o seu aparecimento em doentes não neutropénicos está a ganhar cada vez mais importância (Kosmidis & Denning, 2015). Também pode afetar doentes imunocompetentes quando expostos a uma grande quantidade de esporos *Aspergillus*, e nestes casos ainda é mais difícil o diagnóstico (Kosmidis & Denning, 2015).

As suas manifestações variam com o hospedeiro, quanto maior a imunossupressão, maior a progressão e menos evidentes são os sintomas. Uma percentagem considerável dos doentes é assintomática (Enoch *et al.*, 2006). As manifestações são muito semelhantes às de outros patogénicos causadores de pneumonia, iniciando-se quase sempre com febre persistente. Contudo este sintoma nem sempre está presente em doentes gravemente imunodeprimidos, tendo sido relatado a sua ausência em casos de terapêutica corticosteróide. Outros sintomas podem incluir tosse, que pode ou não ser produtiva, dispneia e ocasionalmente hipoxia. Podem manifestar-se hemoptises e dor pleurítica numa fase mais tardia da infeção, sendo expectável que exista um diagnóstico antes do aparecimento destas complicações para um melhor prognóstico (Gregg & Kauffman, 2015).

A existência de sintomas extrapulmonares pode ser um indicativo de disseminação da infeção. Por exemplo, a sinusite fúngica pode provocar dor facial e corrimento purulento; a endoftalmite causada por *Aspergillus* diminui a acuidade visual e provoca dor ocular; a disseminação da aspergilose pode provocar lesões cutâneas, que começam como pápulas indolores e podem facilmente evoluir, provocando necrose e dor (Gregg & Kauffman, 2015).

A disseminação para o SNC ocorre normalmente em doentes que têm ou já tiveram aspergilose pulmonar invasiva, ou sinusite invasiva. Os sintomas incluem febre (57%), déficit neurológico (35%), convulsões (28%), alteração do estado mental (21%) e dores de cabeça (14%) (Cadena *et al.*, 2016).

6. Diagnóstico

A aspergilose, sobretudo em imunodeprimidos, nunca foi uma infecção fácil de diagnosticar e mesmo com o desenvolvimento de métodos mais modernos continua a ser um dilema (Steinbach, 2013). Os principais fatores responsáveis incluem: a falta de manifestações específicas, o facto de raramente, o fungo poder ser isolado de indivíduos colonizados e a falta de testes com sensibilidade e precisão necessária para o seu diagnóstico precoce (Lackner & Lass-Flörl, 2013). A falta de conhecimento de que novas populações de risco estão a surgir, também pode atrasar o diagnóstico (Patterson & Streck, 2014).

O diagnóstico clínico da aspergilose é muito difícil uma vez que as manifestações clínicas da infecção não são específicas e que facilmente passam por broncopneumonia com o sintoma principal de febre resistente aos antibióticos (Zmeili & Soubani, 2007). Juntamente com a dificuldade de identificação dos sintomas, está a ocasional ausência dos mesmos. Deve ser tido em conta o histórico do paciente e os seus fatores de risco (Thompson & Patterson, 2011).

Os principais critérios disponíveis para o diagnóstico da aspergilose segundo as directrizes de Pauw *et al.* (2008) estão indicados na figura 15.

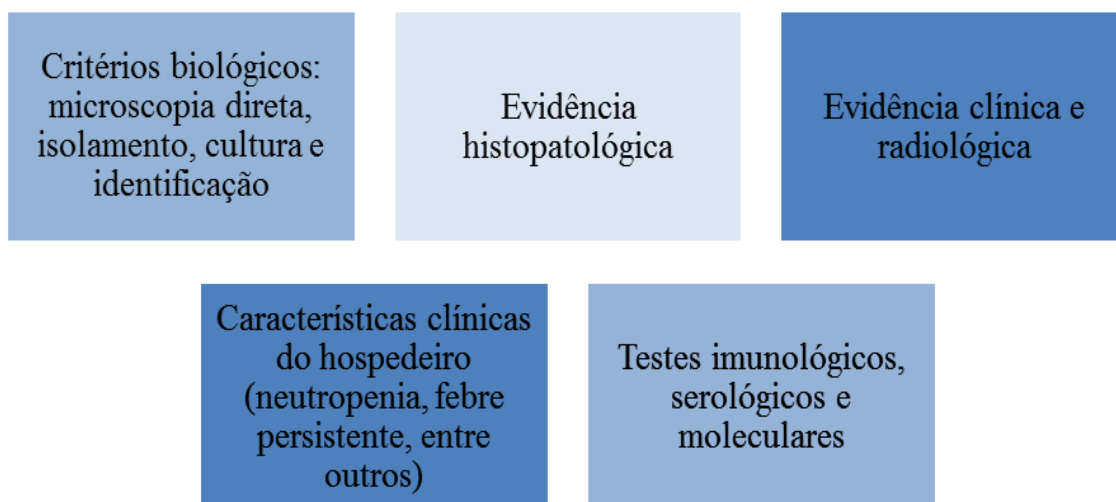


Figura 15 – Critérios de diagnóstico da aspergilose. Retirado e adaptado de (Pauw *et al.*, 2008).

A “European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group” e o “National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG)” definiram três níveis de probabilidade para ajudar no diagnóstico de infecções fúngicas invasivas: provadas, prováveis e possíveis. Para classificar uma infecção como provada, estas diretrizes exigem um diagnóstico histopatológico. Esta categoria não exige a presença de fatores do hospedeiro ou clínicos. Uma infecção fúngica invasiva é classificada como provável aquando da presença simultânea de um fator do hospedeiro, uma característica clínica e evidência micológica. A última categoria definida como possível apenas inclui fatores do hospedeiro e evidência clínica associada, sem suporte micológico (de Pauw *et al.*, 2008).

A versão mais recente das Orientações Práticas para o Diagnóstico e Tratamento da Aspergilose da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas recomenda que o diagnóstico da aspergilose invasiva seja feita por meio de, simultaneamente, exame cultural e histopatológico a partir de tecidos ou fluidos. Apenas em casos que isso não seja possível deve ser utilizado um método de identificação molecular (Patterson *et al.*, 2016).

6.1. Diagnóstico laboratorial

A **observação microscópica** de uma amostra é o método mais simples, por outro lado é muito pouco específico e por isso muito facilmente confundido com qualquer outro fungo filamentoso. Para além disso não consegue distinguir entre colonização e infecção (Barton, 2013).

O **exame histológico** é um bom método de confirmação do diagnóstico da aspergilose, mas muitas vezes a recolha da amostra não é viável devido à natureza invasiva do procedimento e o estado grave do doente, podendo por em risco a sua saúde (Barton, 2013; Cadena *et al.*, 2016). As hifas do *Aspergillus* rapidamente são detectadas nos tecidos (Swoboda-Kopeć *et al.*, 2016), apresentando-se normalmente septadas e estreitas, com um diâmetro que costuma variar entre 1 a 3 µm. Contudo costuma ser difícil distinguir este género de outros fungos causadores de infecção (Barton, 2013)

O diagnóstico através de **cultura** é um método simples e barato mas torna-se demasiado moroso e menos eficaz uma vez que está dependente da qualidade da amostra e ainda está sujeito a contaminações (Swoboda-Kopeć *et al.*, 2016). A possibilidade de falsos-negativo também é significativa, principalmente em amostras de doentes que já estão a receber terapêutica antifúngica ou se amostra não tiver contactado com o local infetado. Assim, uma cultura negativa, não pode excluir a hipótese de aspergilose quando este tenha sido o único teste realizado. Contudo é importante fazê-lo sempre que possível, para identificar e diferenciar *Aspergillus* de outros fungos filamentosos (Patterson *et al.*, 2016). Uma cultura positiva tem a mais-valia de posteriormente permitir a realização de testes de susceptibilidade aos antifúngicos (Barton, 2013; Swoboda-Kopeć *et al.*, 2016).

Os **testes imunológicos** vieram tentar responder à necessidade de existir métodos de diagnóstico que não exigissem a recolha de amostras do paciente (Cadena *et al.*, 2016). Assim, desde 2003 que existe um teste de ELISA, Platelia *Aspergillus* EIA ®, um ensaio imunoenzimático de tipo sanduíche, para a detecção do antígeno galactomanano de *Aspergillus*, que veio permitir um diagnóstico não invasivo da infeção. Funciona a partir de um anticorpo monoclonal de rato, direccionado contra o epítipo predominante do antígeno da parede celular do fungo (Steinbach, 2013). Apesar de este método ter a vantagem de ser um método não invasivo pode não ser a melhor opção em diagnósticos tardios principalmente se já houver uma terapêutica antifúngica a decorrer, uma vez que vai influenciar a sensibilidade do teste (Swoboda-Kopeć *et al.*, 2016).

A **detecção de (1→3) - β-D-glucano** é outro método não invasivo e muito útil mesmo em doentes sob terapêutica antifúngica (Swoboda-Kopeć *et al.*, 2016). Este glucano é um dos componentes pertencentes da parede celular fúngica e pode ser detetado para confirmar a presença de um fungo na amostra, contudo não diferencia o género, não sendo específico para *Aspergillus* (Murray *et al.*, 2010).

Testes moleculares, a partir de PCR, demonstram uma grande sensibilidade, mas ainda não são muito utilizados por causa da exigência de equipamento especializado e uniformização de protocolos. Um dos benefícios desta técnica é a possibilidade de poder fazer uma identificação ao nível da espécie (Steinbach, 2013). Estudos continuam a ser realizados a cerca destes métodos e nomeadamente, já existem alguns dados que têm demonstrado o seu benefício quando combinado com a detecção de GM (Cadena *et al.*, 2016).

6.2. Imagiologia

A imagiologia pode ser uma ferramenta importante no diagnóstico e gestão da aspergilose pulmonar, uma vez que é o pulmão a principal porta de entrada do fungo. Este método de diagnóstico permite obter imagens a partir de tomografia computadorizada e raios-x. A tomografia computadorizada é considerada a técnica de imagiologia de eleição, uma vez que é mais específica e sensível na avaliação das lesões que os raios-x. Os raios-x também são menos convenientes devido à sua menor complexidade, custo e devido à exposição de radiação a que submete os doentes. Contudo, em casos críticos, pode ser necessário a utilização de ambas as técnicas (Greene, 2005). As orientações da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas recomendam que se faça um exame de tomografia computadorizada quando existe suspeita clínica de aspergilose pulmonar invasiva independentemente de resultados de raios-x (Patterson *et al.*, 2016).

O diagnóstico através de imagens vem tentar ultrapassar as dificuldades de obtenção de um diagnóstico mais célere através dos outros métodos. A presença do sinal de halo fornece um diagnóstico provável aspergilose pulmonar invasiva precoce em pacientes em alto risco e ocorre apenas precocemente no decurso da doença (Greene, 2005). As principais características radiológicas da aspergilose pulmonar são pequenos nódulos com halo e “focal ground glass” (Figura 16) (Brook *et al.*, 2009).

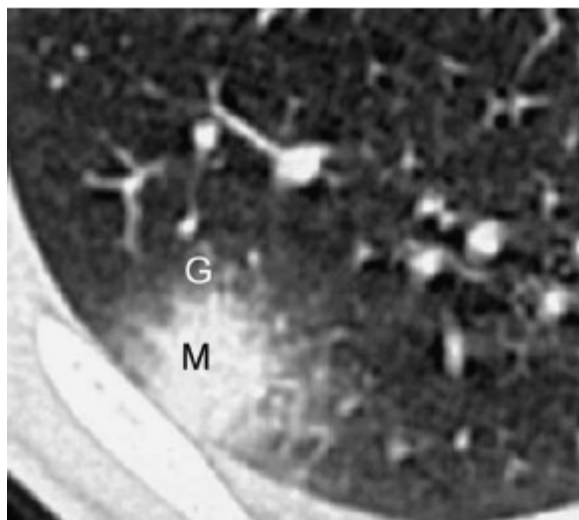


Figura 16 – Uma imagem de tomografia computadorizada exibindo um sinal de halo num caso de aspergilose pulmonar invasiva. Retirado e adaptado de (Greene, 2005).

O melhor diagnóstico da aspergilose quando esta dissemina para os SNC é através da característica lesão em massa que se forma (Figura 17).

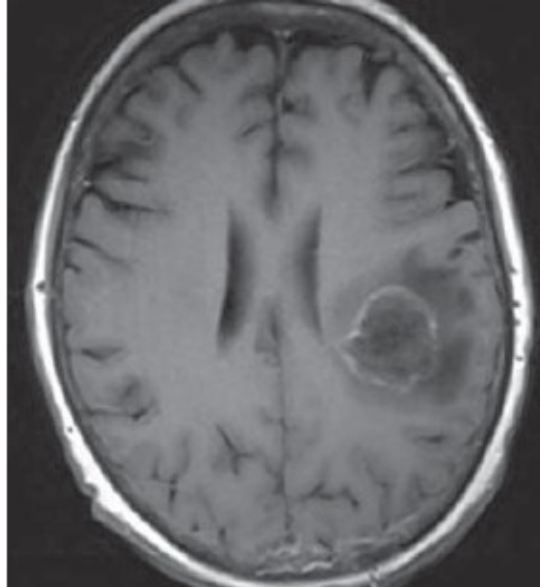


Figura 17 – Imagem de uma lesão provocada pela aspergilose invasiva disseminada. Retirado e adaptado de (Kousha, Tadi & Soubani, 2011).

A tomografia computadorizada pode ser útil quando usado precocemente, mas não serve, por si só, como método de diagnóstico. Os halos observados não são específicos de aspergilose invasiva, também pode ocorrer noutro tipo de lesões (Swoboda-Kopeć *et al.*, 2016).

7. Tratamento

No tratamento de doentes sujeitos a terapêutica imunossupressora, é de extrema importância que se comece por reduzir significativamente a dose dessa medicação, ou mesmo excluir, quando possível, antes do início da terapêutica antifúngica. Assim como, em certos casos, também pode ser recomendado a utilização de fatores de estimulação de colónias e transfusões de granulócitos. No que diz respeito ao tratamento da aspergilose em simultâneo com quimioterapia, esta deve ser uma decisão ponderada pelos vários especialistas tendo em conta as condições e riscos de cada doente (Patterson *et al.*, 2016).

O tratamento da aspergilose é muito variável e depende do tipo de manifestação. As manifestações alérgicas da aspergilose, como a aspergilose broncopulmonar alérgica, requerem uma combinação de antifúngicos e anti-inflamatórios, como por exemplo, itraconazol e corticosteróides. A aspergilose pulmonar cavitária crónica e necrotizante crónica exigem terapêutica prolongada. Já um aspergiloma pode ter de ser removidos cirurgicamente (Patterson *et al.*, 2016). Na aspergilose pulmonar invasiva, é muito importante que se inicie o tratamento o mais rapidamente possível para um melhor prognóstico (Cadena *et al.*, 2016). A terapêutica direcionada e de primeira linha, para a aspergilose pulmonar invasiva, a aspergilose crónica e aspergilose do SNC é semelhante, sendo que para a maioria dos doentes, a indicação é voriconazol intravenoso ou oral (Patterson *et al.*, 2016). Contudo quando a aspergilose afeta o SNC, por vezes, a cirurgia também demonstra ter um bom resultado como tratamento (Cadena *et al.*, 2016). A aspergilose pulmonar invasiva quando não é tratada de forma apropriada é facilmente agravada com disseminação para o SNC, coração, veias ou outras estruturas contíguas ao pulmão (Alderson, Van Dinter, Opatowsky & Burton, 2005; Cadena *et al.*, 2016).

O tratamento empírico também pode ser necessário em doentes com neutropenia prolongada e febre persistente. Por outro lado, é desaconselhada em doentes com uma duração de neutropenia inferior a 10 dias. Esta modalidade de terapêutica inclui como opções: anfotericina B lipossómica, caspofungina, micafungina ou voriconazol (Patterson *et al.*, 2016).

7.1. Polienos

A **anfotericina B** é um antifúngico da classe dos polienos. O seu espectro de acção é grande e abrange a maioria dos fungos filamentosos e leveduriformes (Enoch, Ludlam & Brown, 2006; Khan, El-Charabat & El-Sayegh, 2015). Uma das exceções é o *A. terreus*, que tem demonstrado ser resistente a este fármaco (Enoch *et al.*, 2006; Arendrup, Cuenca-Estrella, Lass-Flörl & Hope, 2012).

A sua estrutura molecular básica é composta por um anel lactâmico, uma região hidrofóbica, com 3 a 7 ligações duplas, e uma região hidrofílica (figura 18) (Murray *et al.*, 2010; Hamill, 2013).

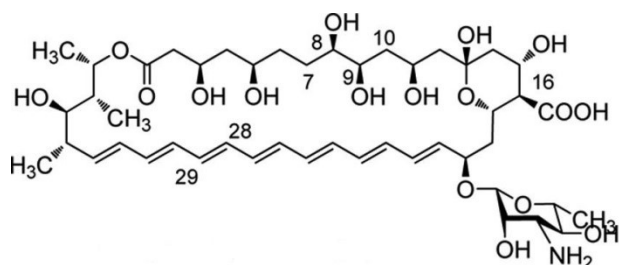


Figura 18 – Estrutura química da Anfotericina B. Retirada e adaptada de (Tevyashova *et al.*, 2013).

A sua administração é por perfusão IV, uma vez que não é absorvida oralmente. O seu mecanismo de acção baseia-se, fundamentalmente, na sua grande afinidade de ligação ao ergosterol, o esterol principal constituinte da membrana celular fúngica, e também ao colesterol, mas mais fraca e menos eficazmente. Estas ligações levam à formação de canais de iões, resultando na morte celular (Patterson *et al.*, 2016).

Este fármaco acarreta um grande risco de nefrotoxicidade, para além de outros efeitos secundários como febre, arrepios, náuseas e vômitos e hipotensão. A nefrotoxicidade é mais provável com o uso concomitante de outros agentes nefrotóxicos (Enoch *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2015; Patterson *et al.*, 2016).

A sua utilização só deve ser considerada uma opção quando todas as outras alternativas não estejam disponíveis (Patterson *et al.*, 2016).

Existem 3 **formulações lipídicas da Anfotericina B**, aprovadas tanto nos EUA como na UE: ABCD (Amphocil® ou Amphotec®), ABLC (Abelcet®) e L-AMB (AmBisome®) (Enoch *et al.*, 2006; Patterson *et al.*, 2016). A necessidade do desenvolvimento destas formulações derivou da toxicidade da Anfotericina B, principalmente a sua marcada nefrotoxicidade e as reações relacionadas com a sua perfusão (Hamill, 2013; Patterson *et al.*, 2016).

A diferente constituição destes compostos traduz-se também, em diferentes propriedades farmacocinéticas entre eles (Patterson *et al.*, 2016; Hamill, 2013).

Para o tratamento da maioria das infeções fúngicas estas formulações lipídicas são uma alternativa melhor que a anfotericina B convencional. Não só são mais seguras como possuem uma eficácia equivalente ou superior (Hamill, 2013).

7.2. Triazóis

Os triazóis, que fazem parte da classe dos azóis, são os principais antifúngicos usados atualmente no tratamento das infeções causadas por *Aspergillus*, nomeadamente o voriconazol, itraconazol e posaconazol. O fluconazol, apesar de também pertencer aos triazóis, não é ativo contra a *Aspergillus* (Murray *et al.*, 2010; Patterson *et al.*, 2016).

Os antifúngicos triazóis atuam ao nível da biossíntese do ergosterol, inibindo a enzima 14- α demetilase da CYP 450 e levando à alteração do crescimento e replicação da membrana celular fúngica (Khan *et al.*, 2015; Cadena *et al.*, 2016). A sua capacidade de inibição de várias CYP, incluindo humanas, é a causa para alguns dos efeitos adversos e interações medicamentosas que este fármaco pode causar (Cadena *et al.*, 2016).

Têm surgido resistências a esta classe de fármacos, principalmente por parte da espécie *fumigatus*, dificultando a gestão do tratamento da aspergilose (van der Linden *et al.*, 2013; Vermeulen, Lagrou & Verweij, 2013).

O **voriconazol** tem um largo espetro de ação, contra a maioria das espécies de *Aspergillus*, e muitos outros fungos filamentosos, sendo usado para infeções

oportunistas em doentes imunocomprometidos (Gregg & Kauffman, 2015; Khan *et al.*, 2015). O voriconazol está aprovado como tratamento de primeira linha na aspergilose invasiva. Inicia-se a terapêutica com uma dose de 6 mg/kg de 12 em 12 horas, apenas duas vezes, seguido de uma diminuição da dose para 4 mg/kg de 12 em 12 horas (Khan *et al.*, 2015; Patterson *et al.*, 2016). A sua administração pode ser oral ou IV. O uso de voriconazol IV tem de ser cauteloso em insuficientes renais, uma vez que o veículo do fármaco utilizado nesta formulação é excretado a partir do rim e as consequências da sua acumulação são incertas. Deve ser avaliado o risco-benefício individualmente para cada doente. A formulação oral tem boa biodisponibilidade tanto em jejum como às refeições (Patterson *et al.*, 2016), contudo é aconselhado evitar refeições ricas em lípidos para prevenir a sua diminuição (Khan *et al.*, 2015).

O **itraconazol** é um composto altamente lipofílico, que está disponível para administração em cápsulas, solução oral e parentérica. Tem um largo espetro de ação, incluindo ação fungicida contra *Aspergillus*. É usado como alternativa ao voriconazol, em casos de resistência ou intolerância ao tratamento convencional (Murray *et al.*, 2010). Os seus efeitos adversos incluem dor de cabeça, tonturas, aumento das transaminases hepáticas, sintomas gastrointestinais, neuropatia periférica e reações alérgicas (Khan *et al.*, 2015).

O **posaconazol** tem uma estrutura semelhante ao itraconazol (Figura 19) e inicialmente apenas estava disponível em forma de suspensão oral. Atualmente já existem formulações em comprimidos de libertação prolongada e IV (Cadena *et al.*, 2016; Patterson *et al.*, 2016). Os comprimidos contêm um polímero sensível ao pH, e é administrado 300 mg duas vezes durante um dia e depois 300 mg por dia. Têm uma biodisponibilidade superior à suspensão oral e alcança os níveis pretendidos facilmente. O posaconazol é metabolizado no fígado podendo provocar interações com outros fármacos que envolvam enzimas da CYP450 (Cadena *et al.*, 2016).

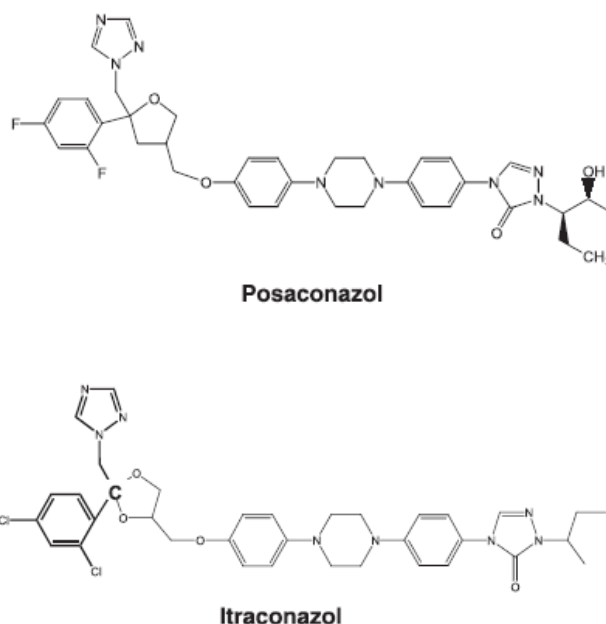


Figura 19 – Estrutura química do posaconazol em comparação com o itraconazol. Retirado e adaptado de (Groll & Lehrnbecher, 2008).

O **isavuconazol** é o mais recente triazol com largo espectro antifúngico (Maertens *et al.*, 2016). É administrado por via oral, iniciando-se com 200 mg, 3 vezes por dia, durante 6 doses e depois passa a 200 mg por dia. Tem uma ótima biodisponibilidade oral, cerca de 98% (Cadena *et al.*, 2016).

Um ensaio de fase III realizado recentemente, demonstrou que a sua eficácia no tratamento da aspergilose invasiva não é inferior ao voriconazol e é melhor tolerado (Maertens *et al.*, 2016).

7.3. Equinocandinas

As equinocandinas são agentes antifúngicos semi-sintéticos, que actuam por inibição não competitiva da síntese de (1→3)-β-D-glucano, um polissacárido da parede celular dos fungos responsável pela forma e pela força da parede celular, para além de serem importantes para o crescimento e divisão celular (Patterson *et al.*, 2016). O seu espectro de ação inclui *Aspergillus* spp mas o seu efeito é apenas fungistático. A caspofungina foi a primeira equinocandina disponível, sendo seguida pela micafungina (Denning, 2003). A sua administração é exclusivamente IV (Enoch *et al.*, 2006; Patterson *et al.*,

2016). Uma vez que a sua actividade antifúngica tem como alvo uma estrutura que não é partilhada pelas células humanas faz com que no geral, as equinocandinas sejam bem toleradas (Gregg & Kauffman, 2015).

As equinocandinas são eficazes em última instância no tratamento da aspergilose invasiva mas não é recomendado o seu uso habitual em monoterapia como tratamento de primeira linha (Cadena *et al.*, 2016; Patterson *et al.*, 2016). Atualmente existem três equinocandinas disponíveis, caspofungina, micafungina e anidulafungina, e as três têm espectro de ação e potência semelhantes contra *Aspergillus* (Murray *et al.*, 2010).

Na tabela 7 encontra-se o resumo dos regimes habitualmente utilizados no tratamento da aspergilose.

Tabela 7 – Resumo das terapêuticas recomendadas para a aspergilose. Retirado e adaptado de (Patterson *et al.*, 2016).

Manifestação	Terapêutica de 1ª linha	Terapêutica de 2ª linha
Tratamento empírico	<p>Anfotericina B (lipossómica) IV: 3 mg/kg/dia.</p> <p>Caspofungina IV: 70 mg no 1º dia, seguido de 50 mg/dia.</p> <p>Micafungina IV: 100 mg/dia.</p> <p>Voriconazol IV: 6 mg/kg de 12/12h no 1º dia, seguido de 4 mg/kg de 12/12h.</p> <p>Voriconazol oral: 200–300 mg de 12/12h, ou 3–4 mg/kg de 12/12h.</p>	

Aspergilose invasiva pulmonar	<p>Voriconazol IV: 6 mg/kg de 12/12h no 1º dia, seguido de 4 mg/kg de 12/12h.</p> <p>Voriconazol oral: 200-300 mg de 12/12h.</p>	<p>Anfotericina B (lipossômica) IV: 3-5 mg/kg/dia.</p> <p>Isavuconazol: 200 mg de 8/8h até 6 doses, passando para 200 mg/dia.</p> <p>Anfotericina B (complexo lipídico) IV: 5 mg/kg/dia.</p> <p>Caspofungina IV: 70 mg no 1º dia, seguido de 50 mg/dia.</p> <p>Micafungina IV: 100-150 mg/dia.</p> <p>Posaconazol oral (suspensão): 200 mg, 3x/dia.</p> <p>Posaconazol oral (comprimidos): 300 mg, 2x/dia, no 1º dia, passando para 300 mg/dia.</p> <p>Posaconazol IV: 300 mg 2x no 1º dia, seguido de 300 mg/dia.</p> <p>Itraconazol oral (suspensão): 200 mg de 12/12h.</p>
Aspergilose do CNS	Semelhante à aspergilose pulmonar invasiva.	<p>Semelhante à aspergilose pulmonar invasiva.</p> <p>Intervenção cirúrgica em alguns casos.</p>
Aspergilose pulmonar cavitária crónica	Semelhante à aspergilose pulmonar invasiva.	Semelhante à aspergilose pulmonar invasiva.

8. Prevenção

As medidas profiláticas podem ser úteis em doentes cujas condições possam potenciar o risco de aspergilose invasiva (Patterson *et al.*, 2016).

Os doentes sob terapêutica imunossupressora estão abrangidos nesse grupo de risco. Tanto doentes sujeitos a transplantes de células-tronco hematopoiéticas com doença do enxerto contra o hospedeiro, doentes de alguns tipos de leucemia, como casos de terapêuticas prolongadas com corticosteróides aumentam o risco de adquirirem aspergilose invasiva, tornando muito provável a necessidade de terapêutica profilática antifúngica. O antifúngico de eleição, que demonstra ser mais eficaz, é o posaconazol. O voriconazol, a micafungina e a caspofungina também são alternativas recomendadas como profilaxia. O itraconazol também pode ser eficaz mas os riscos que acarreta em termos de tolerabilidade, limita o seu uso (Patterson *et al.*, 2016). A tabela seguinte resume os esquemas terapêuticos mais utilizados.

Tabela 8 – Terapêutica da profilaxia da aspergilose invasiva. Retirado e adaptado de (Patterson *et al.*, 2016).

Manifestação	Tratamento de 1ª linha	Tratamento de 2ª linha
Profilaxia da aspergilose invasiva	<p>Posaconazol oral (suspensão): 200 mg 3x/dia.</p> <p>Posaconazol oral (comprimidos): 300 mg 2x no primeiro dia, depois 300 mg/dia.</p> <p>Posaconazol IV: 300 mg 2x no primeiro dia, depois 300 mg/dia</p>	<p>Voriconazol oral: 200 mg 2x/dia.</p> <p>Itraconazol oral (suspensão): 200 mg de 12/12h.</p> <p>Micafungina: 50-100 mg/dia.</p> <p>Caspofungina 50 mg/dia.</p>

Outras medidas de prevenção poderão ser tidas em conta, para além da terapêutica profilática. Os doentes em risco de desenvolver aspergilose devem fazer os possíveis para diminuir a sua exposição aos esporos facilmente dispersos no ambiente.

Os doentes devem estar num ambiente “protegido”, que pode incluir sistemas de filtração de ar a partir de filtros HEPA (high-efficiency particulate air) e sistemas de pressão positiva. No caso dos hospitais ou unidades de cuidados médicos não disponibilizarem este tipo de sistemas, existem outras medidas que podem ser tomadas, como por exemplo, a admissão do doente num quarto privado, longe de locais de construção e não permitir a existência de plantas ou flores. Os doentes de ambulatório que não conseguem preencher estes níveis de exigência, recomenda-se que evitem estar próximos ou praticar qualquer tipo de atividade relacionada com jardinagem, restauração e construção (Patterson *et al.*, 2016).

III. Conclusão

As infeções fúngicas invasivas têm ganho terreno nos últimos anos, consequência do aumento da população cada vez mais susceptível a estas infeções. Uma vez que se trata de um fungo ubiquitário, *Aspergillus* facilmente é inalado pelo Homem, porém raramente causa infeção em doentes imunocompetentes. A aspergilose continua a ser uma infeção difícil de tratar e por isso, muitas vezes fatal. Ainda assim a mortalidade para alguns pacientes de alto risco diminuiu nos últimos anos, resultado do desenvolvimento de técnicas de diagnóstico que permitem a identificação do fungo cada vez mais cedo e do desenvolvimento de antifúngicos cada vez mais eficazes. Um bom exemplo disso é o isavuconazol, o mais recente antifúngico do grupo dos triazóis, que este ano foi incluído nas recomendações do tratamento da aspergilose, como terapêutica alternativa. Este fármaco já demonstrou ser eficaz contra esta infeção e com a vantagem de apresentar menos efeitos adversos, o que também é muito importante para resguardar os doentes infetados que já se encontram muito debilitados. Apesar de ainda não ser recomendado pela Sociedade Americana de Doenças Infecciosas como terapêutica de primeira linha, existem estudos que defendem a sua utilização como tratamento primário, e no futuro pode vir a ser possível que o isavuconazol substitua o voriconazol.

Por outro lado o diagnóstico continua a ser tardio, porque apesar de já existirem novos métodos, mais sensíveis e específicos, muitos ainda não estão suficientemente desenvolvidos para serem aplicados na prática. Assim as recomendações são para que se proceda à examinação histológica e de cultura, sendo que ambos os processos são morosos e pouco sensíveis.

Atualmente, ainda continuam a existir muitas questões por responder acerca desta infeção, como por exemplo o possível benefício da utilização de terapêutica combinada, qual a melhor terapêutica para infeções resistentes e que mais populações de risco poderiam beneficiar de profilaxia. Posto isto, é necessário continuar a investigar e a desenvolver novos métodos, nomeadamente de diagnóstico e tratamento, para ultrapassar as dificuldades que esta infeção ainda acarreta. Seria igualmente importante aprofundar as estratégias do patogénico sobre o sistema imunitário do hospedeiro, para compreender melhor a sua patogénese e descobrir possíveis alvos terapêuticos.

IV. Bibliografia

- Aimanianda, V., Bayry, J., Bozza, S., Kniemeyer, O., Perruccio, K., Elluru, S.R. e Latgé, J-P. (2009). Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature* 460(7259), 1117–1121. doi: 10.1038/nature08264.
- Alderson, J. W., Van Dinter, T. G., Opatowsky, M. J. e Burton, E. C. (2005). Disseminated Aspergillosis Following Infliximab Therapy in an Immunosuppressed Patient with Crohn's Disease and Chronic Hepatitis C: A Case Study and Review of the Literature. *Medscape General Medicine*, 7(3), 7.
- Amin, S., Thywissen, A., Heinekamp, T., Saluz, H. P. e Brakhage, A. A. (2014). Melanin dependent survival of *Aspergillus fumigatus* conidia in lung epithelial cells. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(5), 626-636. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.04.009.
- Arendrup, M. C. (2014). Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. *Clin Microbiol Infect*, 20(6), 42–48. Doi: 10.1111/1469-0691.12513.
- Arendrup, M. C., Cuenca-Estrella, M., Lass-Flörl, C. e Hope, W. W. (2012). EUCAST technical note on *Aspergillus* and amphotericin B, itraconazole, and posaconazole. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(7), E248-E250. Doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03890.x.
- Azie, N., Neofytos, D., Pfaller, M., Meier-Kriesche, H. U., Quan, S. P. e Horn, D. (2012). The PATH (Prospective Antifungal Therapy) Alliance® registry and invasive fungal infections: update 2012. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 73(4), 293-300. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.012.
- Balloy, V. e Chignard, M. (2009). The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. *Microbes and Infection*, 11(12), 919–927. doi: 10.1016/j.micinf.2009.07.002.
- Barton, R. C. (2013). Laboratory Diagnosis of Invasive Aspergillosis: From Diagnosis to Prediction of Outcome. *Scientifica*. doi:10.1155/2013/459405.
- Binder, U. e Lass-Flörl, C. (2013) New insights into invasive aspergillosis - from the pathogen to the disease. *Curr Pharm Des* 19: 3679–3688. doi: 10.2174/13816128113199990366.

- Brook, O. R., Guralnik, L., Hardak, E., Oren, I., Sprecher, H., Zuckerman, T., ... Yigla, M. (2009). Radiological findings of early invasive pulmonary aspergillosis in immune-compromised patients. *Hematological oncology*, 27(2), 102-106. doi: 10.1002/hon.879.
- Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A., Levitz, S. M., Netea, M. G. e White, T. C. (2012). Hidden killers: human fungal infections. *Science translational medicine*, 4(165), 165rv13. Doi: 10.1126/scitranslmed.3004404.
- Bukhari, E. e Alrabiaah, A. (2009). First case of extensive spinal cord infection with *Aspergillus nidulans* in a child with chronic granulomatous disease. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 3(4), 321-323. doi:10.3855/jidc.132.
- Cadena, J., Thompson, G. R. e Patterson, T. F. (2016). Invasive Aspergillosis: Current Strategies for Diagnosis and Management. *Infectious disease clinics of North America*, 30(1), 125-142. doi: 10.1016/j.idc.2015.10.015.
- Camargo, J. F. e Husain, S. (2014). Immune correlates of protection in human invasive aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*, 59(4), 569-577. doi: 10.1093/cid/ciu337.
- Chabi, M. L., Goracci, A., Roche, N., Paugam, A., Lupo, A. e Revel, M. P. (2015). Pulmonary aspergillosis. *Diagnostic and interventional imaging*, 96(5), 435-442. doi: 10.1016/j.diii.2015.01.005.
- Chen, K., Man, K., Metselaar, H. J., Janssen, H. L. A., Peppelenbosch, M. P. e Pan, Q. (2014). Rationale of personalized immunosuppressive medication for hepatocellular carcinoma patients after liver transplantation. *Liver Transplantation*, 20(3), 261-269. doi: 10.1002/lt.23806.
- Chotirmall, S. H., Al-Alawi, M., Mirkovic, B., Lavelle, G., Logan, P. M., Greene, C. M. e McElvaney, N. G. (2013). *Aspergillus*-Associated Airway Disease, Inflammation, and the Innate Immune Response. *BioMed Research International*. doi:10.1155/2013/723129.

- Chotirmall, S. H., Mirkovic, B., Lavelle, G. M., e McElvaney, N. G. (2014). Immuno-evasive *Aspergillus* virulence factors. *Mycopathologia*, 178(5-6), 363-370. Doi: 10.1007/s11046-014-9768-y.
- Cornely, O. A., Maertens, J., Bresnik, M., Ebrahimi, R., Ullmann, A. J., Bouza, E., ... Aoun, M. (2007). Liposomal amphotericin B as initial therapy for invasivemold infection: a randomized trial comparing a high-loading dose regimen with standard dosing (AmBiLoad trial). *Clinical infectious diseases*, 44(10), 1289–1297. doi: 10.1086/514341.
- Cramer, R. A., Rivera, A. e Hohl, T. M. (2011). Immune responses against *Aspergillus fumigatus*: what have we learned?. *Current opinion in infectious diseases*, 24(4), 315-322. doi: 10.1097/QCO.0b013e328348b159.
- Cruz, R. (2014). Guía para el diagnóstico de laboratorio de enfermedad fúngica invasora por hongos filamentosos. *Revista chilena de infectología*, 31(2), 173-179.
- Dagenais, T.R. e Keller, N.P. (2009). Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 22(3), 447–465. doi:10.1128/CMR.00055-08.
- Deak, E., Wilson, S. D., White, E., Carr, J. H., e Balajee, S. A. (2009). *Aspergillus terreus* Accessory Conidia Are Unique in Surface Architecture, Cell Wall Composition and Germination Kinetics. *PLoS ONE*, 4(10), e7673. doi:10.1371/journal.pone.0007673.
- Denning, D. W. (2003). Echinocandin antifungal drugs. *Lancet*, 362, 1142–51.
- Denning, D. W., Pashley, C., Hartl, D., Wardlaw, A., Godet, C., Del Giacco, S., ... Sergejeva, S. (2014) Fungal allergy in asthma-state of the art and research needs. *Clin Transl Allergy* 4: 14.
- de Pauw, B., Walsh, T. J., Donnelly J. P., Stevens, D. A., Edwards, J. E., Calandra, T. e Bennett, J. E. (2008). Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis*, 46(12), 1813–21. doi:10.1086/588660.

- de Smet, K. e Contreras, R. (2005). Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnology Letters*, 27(18), 1337–1347. Doi: 10.1007/s10529-005-0936-5.
- Enoch, D. A., Ludlam, H. A., e Brown, N. M. (2006). Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *Journal of medical microbiology*, 55(7), 809-818. Doi: 10.1099/jmm.0.46548-0.
- Escobar, N., Ordonez, S. R., Wösten, H. A. B., Haas, P.-J. A., de Cock, H., e Haagsman, H. P. (2016). Hide, Keep Quiet, and Keep Low: Properties That Make *Aspergillus fumigatus* a Successful Lung Pathogen. *Frontiers in Microbiology*, 7, 438. doi: 10.3389/fmicb.2016.00438.
- Garcia-Vidal, C., Viasus, D. e Carratalà, J. (2013). Pathogenesis of invasive fungal infections. *Current opinion in infectious diseases*, 26(3), 270-276. doi:10.1097/QCO.0b013e32835fb920.
- Greene, R. (2005). The radiological spectrum of pulmonary aspergillosis. *Med Mycol* 43(1), 147-154. doi: 10.1080/13693780500064771.
- Gregg, K. S. e Kauffman, C. A. 2015. Invasive aspergillosis: epidemiology, clinical aspects, and treatment. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, 36(5), 662-672. Doi: 10.1055/s-0035-1562893.
- Groll, A. H. e Lehnbecher, T. (2008). Posaconazole for paediatric patients: status of development and future perspectives. *Mycoses*, 51(2), 5-11. Doi: 10.1111/j.1439-0507.2008.01569.x.
- Gugnani, H. C. (2003) Ecology and taxonomy of pathogenic aspergilli. *Front. Biosci.* 8:s346–s357. doi:10.2741/1002.
- Haas H. (2012). Iron: a key nexus in the virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Frontiers in Microbiology*, 3(28). doi: 10.3389/fmicb.2012.00028.
- Hamill, R. J. (2013). Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. *Drugs*, 73, 919-934. Doi: 10.1007/s40265-013-0069-4.

- Heinekamp, T., Schmidt, H., Lapp, K., Pähitz, V., Shopova, I., Köster-Eiserfunke, N., ... Brakhage, A. A. (2015). Interference of *Aspergillus fumigatus* with the immune response. *Seminars in immunopathology* 37(2), 141-152. Doi: 10.1007/s00281-014-0465-1
- Herbrecht, R., Bories, P., Moulin, J. C., Ledoux, M. P. e Letscher-Bru, V. (2012). Risk stratification for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1272(1), 23-30. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06829.x
- Horn, B. W., Moore, G. G., e Carbone, I. (2009). Sexual reproduction in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 101(3), 423-429. doi:10.3852/09-011.
- Howard, S. J. (2014). Multi-resistant aspergillosis due to cryptic species. *Mycopathologia*, 178(5-6), 435-439. Doi: 10.1007/s11046-014-9774-0.
- Khan, A., El-Charabaty, E. e El-Sayegh, S. (2015). Fungal infections in renal transplant patients. *Journal of clinical medicine research*, 7(6), 371-378. doi: 10.14740/jocmr2104w.
- Kosmidis, C. e Denning, D.W. (2015) Republished: the clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Postgrad Med J* 91: 403–410.
- Kousha, M., Tadi, R. e Soubani, A. O. (2011). Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *European Respiratory Review*, 20(121), 156-174. doi: 10.1183/09059180.00001011.
- Lackner, M. e Lass-Flörl, C. (2013). Up-date on diagnostic strategies of invasive aspergillosis. *Curr Pharm Des*, 19(20), 3595–3614. Doi: 10.2174/13816128113199990323.
- Lamoth, F. (2016). *Aspergillus fumigatus*-Related Species in Clinical Practice. *Frontiers in Microbiology*, 7, 683. doi: 10.3389/fmicb.2016.00683
- Malat, G. e Culkin, C. (2016). The ABCs of Immunosuppression: A Primer for Primary Care Physicians. *Med Clin North Am*, 100(3). doi: 10.1016/j.mcna.2016.01.003.

- Margalit, A. e Kavanagh, K. (2015). The innate immune response to *Aspergillus fumigatus* at the alveolar surface. *FEMS microbiology reviews*, 39(5):670-87. doi: 10.1093/femsre/fuv018.
- Maertens, J. A., Raad, I. I., Marr, K. A., Patterson, T. F., Kontoyiannis, D. P., Cornely, O. A. ... Ullmann, A. J. (2016). Isavuconazole versus voriconazole for primary treatment of invasive mould disease caused by *Aspergillus* and other filamentous fungi (SECURE): a phase 3, randomised-controlled, non-inferiority trial. *Lancet*, 387(10020). doi: 10.1016/S0140-6736(15)01159-9.
- McCormick, A., Loeffler, J. e Ebel, F. (2010). *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. *Cellular microbiology*, 12(11), 1535-1543. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01517.x.
- Morton, C. O., Bouzani, M., Loeffler, J. e Rogers, T. R. (2012). Direct interaction studies between *Aspergillus fumigatus* and human immune cells; what have we learned about pathogenicity and host immunity?. *Frontiers in microbiology*, 3, 413. doi: 10.3389/fmicb.2012.00413.
- Murray, P. R., Rossenthal, K. S. e Pfaller, M. A. (2010). *Microbiologia Médica*, 6ª edição, Elsevier Editora Ltda, pp. 661-768. ISBN: 978-85-352-4996-5.
- Ofori, A., Steinmetz, A. R., Akaasi, J., Frimpong, G. A. A. A., Norman, B. R., Obeng-Baah, J., ... Phillips, R. O. (2016). Pulmonary aspergilloma: An evasive disease. *International journal of mycobacteriology*, 5(2), 235-239.
- Ohba, H., Miwa, S., Shirai, M., Kanai, M., Eifuku, T., Suda, T., ... Chida, K. (2012). Clinical characteristics and prognosis of chronic pulmonary aspergillosis. *Respir Med* 106: 724–729. doi:10.1016/j.rmed.2012.01.014.
- Patterson, K. C. e Strek, M. E. (2014). Diagnosis and treatment of pulmonary aspergillosis syndromes. *Chest*, 146(5), 1358-1368. doi: 10.1378/chest.14-0917.
- Patterson, T. F., Thompson, G. R., Denning, D. W., Fishman, J. A., Hadley, S., Herbrecht, R., ... Bennett, J. E. (2016). Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 63(4), e1-e60. doi: 10.1093/cid/ciw326.

- Paulussen, C., Hallsworth, J. E., Álvarez-Pérez, S., Nierman, W. C., Hamill, P. G., Blain, D., ... Lievens, B. (2016). Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microbial biotechnology*. Doi: 10.1111/1751-7915.12367.
- Prakash, R. e Jha, S. N. (2014). Basics of the Genus *Aspergillus*. *International Journal of Research in Botany*, 4(2), 26–30.
- Rathee, P., Chaudhary, H., Rathee, S., Rathee, D. e Kumar, V. (2013). Immunosuppressants: A Review. *The Pharma Innovation*, 1(12), 90-101.
- Ratnaweera, P. B., de Silva, E. D., Williams, D. E. e Andersen, R. J. (2015). Antimicrobial activities of endophytic fungi obtained from the arid zone invasive plant *Opuntia dillenii* and the isolation of equisetin, from endophytic *Fusarium* sp. *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1), 1. doi: 10.1186/s12906-015-0722-4.
- Ravikumar, S., Win, M. S. e Chai, L. Y. (2015). Optimizing Outcomes in Immunocompromised Hosts: Understanding the Role of Immunotherapy in Invasive Fungal Diseases. *Frontiers in Microbiology*. 6(1322). doi: 10.3389/fmicb.2015.01322
- Sabino, R., Veríssimo, C., Parada, H., Brandão, J., Viegas, C., Carolino, E., ... Stevens, D. A. (2014). Molecular screening of 246 Portuguese *Aspergillus* isolates among different clinical and environmental sources. *Medical mycology*, 00, 1-12. doi: 10.1093/mmy/myu006.
- Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H. W., ... Frisvad, J. C. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 78, 141-173.
- Scharf, D. H., Heinekamp, T., Remme, N., Hortschansky, P., Brakhage, A. A. e Hertweck, C. (2012). Biosynthesis and function of gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(2), 467-472. doi: 10.1007/s00253-011-3689-1.
- Schweer, K.E., Bangard, C., Hekmat, K. e Cornely, O.A. (2014) Chronic pulmonary aspergillosis. *Mycoses* 57: 257–270. doi: 10.1111/myc.12152.

- Steinbach, W. J. (2013). Are We There Yet? Recent Progress in the Molecular Diagnosis and Novel Antifungal Targeting of *Aspergillus fumigatus* and Invasive Aspergillosis. *PLoS Pathogens*, 9(10). Doi: 10.1371/journal.ppat.1003642
- Steinbach, W. J., Marr, K. A., Anaissie, E. J., Azie, N., Quan, S. P., Meier-Kriesche, H. U., ... Horn, D. L. (2012). Clinical epidemiology of 960 patients with invasive aspergillosis from the PATH Alliance registry. *Journal of Infection*, 65(5), 453-464. doi: 10.1016/j.jinf.2012.08.003.
- Sugui, J. A., Kwon-Chung, K. J., Juvvadi, P. R., Latgé, J. P. e Steinbach, W. J. (2014). *Aspergillus fumigatus* and related species. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(2), a019786. doi: 10.1101/cshperspect.a019786.
- Swoboda-Kopeć, E., Sikora, M., Piskorska, K., Gołaś, M., Netsvyetayeva, I., Przybyłowska, D. e Mierzwińska-Nastalska, E. (2016). Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Doi: 10.1007/5584_2016_145.
- Tak, V., Mathur, P., Xess, I., Kale, P., Sagar, S. e Misra, M. C. (2013) A case of dual infection in a paediatric trauma victim of primary cutaneous aspergillosis caused by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus terreus*. *Indian J Med Microbiol*, 31:193-6. doi: 10.4103/0255-0857.115232.
- Tevyashova, A. N., Olsufyeva, E. N., Solovieva, S. E., Printsevskaya, S. S., Reznikova, M. I., Trenin, A. S., ... Preobrazhenskaya, M. N. (2013). Structure-antifungal activity relationships of polyene antibiotics of the amphotericin B group. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(8), 3815-3822. doi:10.1128/AAC.00270-13.
- Thompson, G. R. e Patterson, T. F. (2011). Pulmonary aspergillosis: recent advances. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, 32(6) 673-681. doi: 10.1055/s-0031-1295715.
- Thywißen, A., Heinekamp, T., Dahse, H. M., Schmalzer-Ripcke, J., Nietsche, S., Zipfel, P. F. e Brakhage, A. A. (2011). Conidial dihydroxynaphthalene melanin of the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* interferes with the host endocytosis pathway. *Frontiers in microbiology*, 2, 96. doi: 10.3389/fmicb.2011.00096.

- van der Linden, J. W. M., Camps, S. M. T., Kampinga, G. A., Arends, J. P. A., Debets-Ossenkopp, Y. J., Haas, P. J. A., ... Verweij, P. E. (2013). Aspergillosis due to voriconazole highly resistant *Aspergillus fumigatus* and recovery of genetically related resistant isolates from domiciles. *Clinical infectious diseases*, 57(4), 513–20. doi: 10.1093/cid/cit320.
- Vermeulen, E., Lagrou, K. e Verweij, P. E. (2013). Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a growing public health concern. *Current opinion in infectious diseases*, 26. doi: 10.1097/QCO.0000000000000005.
- Warris, A. (2014). The biology of pulmonary *Aspergillus* infections. *Journal of infection*, 69(1), S36-41. doi: 10.1016/j.jinf.2014.07.011.
- Zdanowicz, M. M. (2009). The pharmacology of immunosuppression.. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 73(8).
- Zmeili, O. S. e Soubani, A. O. (2007). Pulmonary aspergillosis: a clinical update. *Qjm*, 100(6), 317-334. doi:10.1093/qjmed/hcm0.